

UFR des Sciences de la Vie et de la Terre
UNIVERSITE LOUIS PASTEUR – STRASBOURG I

THESE DE DOCTORAT

Discipline 42000 06

Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

En vue d'obtenir le titre de :

Docteur de l'Université Louis Pasteur –Strasbourg I

Alexandre BENEDETTO

**Etude de l'exocytose à la membrane apicale
des cellules épithéliales de *Caenorhabditis elegans***

Soutenue le 9 novembre 2006 devant le jury composé de :

Dr. Catherine-Laure TOMASETTO	Rapporteur interne
Dr. Jean COHEN	Rapporteur externe
Dr. Jean-Louis BESSEREAU	Rapporteur externe
Dr. Clotilde THERY	Examinateur
Pr. Jean-Marc REICHHART	Examinateur
Dr. Michel LABOUESSE	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS.

En premier lieu, je tiens sincèrement à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je me réjouis de pouvoir réunir à cette occasion des spécialistes de différents domaines qui sont connectés à travers ma thèse, et dans lesquels mon expérience est encore très limitée. Au sein de ce jury, je tiens à remercier particulièrement les docteurs Catherine-Laure Tomasetto, Jean-Louis Bessereau et Jean Cohen qui ont accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et auront peut-être davantage souffert de la touffeur de mon introduction.

Au niveau de mon laboratoire d'accueil, je souhaite d'abord remercier mon tuteur et directeur de thèse Michel Labouesse pour son accueil, sa disponibilité quotidienne, et son intérêt indéfectible pour la science qui le conduit à proposer des sujets audacieux et captivants pour lesquels il est régulièrement financé, ce qui fait que je n'ai manqué de rien, si ce n'est peut-être de deux ou trois paires de mains pour faire tout ce que nous avions imaginé. Merci aussi Michel, pour toutes les opportunités que tu m'as données d'assister et de participer à des congrès, aux cours de Cold Spring Harbor Laboratory, pour tes conseils et ton soutien dans la poursuite de ma jeune carrière scientifique. Merci enfin pour ce que tu fais pour la communauté scientifique française et locale.

Un grand merci à mon ami Samuel Liégeois qui a accompli un travail remarquable sanctionné par le doctorat il y a près d'un an, et qui a généré d'excellents outils puis fait des observations décisives en amont et au cours de ma thèse dans le cadre de notre collaboration sur les articles pour lesquels nous sommes cosignataires. Merci aussi à Jean-Marie Garnier l'as du clonage en série, et à Yannick Schwab (à nouveau papa, bravo !) dont les compétences, l'enthousiasme et la volonté ont rendu possible la mise au point de la microscopie électronique HPF (Haute Pression à Froid) et de l'immunolocalisation sur coupes ultrafines en deux mois. Merci à Satis Sookareha pour la production des protéines recombinantes et la purification des anticorps qui nous ont été si précieux. Merci à Grégoire Michaux et Guillaume Belliard qui sont les premiers à avoir travaillé sur la sécrétion apicale au laboratoire. Merci à toutes les autres personnes que j'ai pu croiser au laboratoire au cours de ces quatre années, qui m'ont donné des coups de main occasionnellement, et qui ont enrichi ma vie strasbourgeoise : Frédéric, Marie, Hala, Anne-Sophie, Frédéric, Yasuko, Christelle, Jérôme, Sophie, Emmanuel, Suzanna. Merci aux « nématophiles » nouveaux venus : Sophie Jarriault, Laure-Anne, Valeria, Jay, Konstantinos. Merci à ma famille et mes ami(e)s (de l'IGBMC et d'ailleurs) que je ne listerai pas ici mais dont je mesure pleinement la contribution indirecte à ce travail par ce qu'ils m'ont appris, par leur soutien, et leur aide aux moments les plus pénibles.

PREAMBULE :

Au cours de ma thèse, initialement abordée par la génétique du développement, j'ai glissé progressivement vers la biologie cellulaire des membranes et la problématique du trafic intracellulaire. J'estime avoir eu énormément de chance d'avoir pu évoluer non seulement au niveau technique, mais aussi au niveau théorique, en étant amené à m'intéresser à des processus cellulaires et physiologiques variés. La nécessité d'avoir une vue globale du sujet malgré ses nombreuses extensions m'a conduit à faire une bibliographie assez lourde qui se ressent probablement dans l'introduction. Les revues mettent rarement ensemble ces différentes données et se focalisent sur des questions particulières. J'ai pensé que l'introduction de cette thèse pouvait servir de base bibliographique pour la poursuite du travail que j'ai initié. J'ai donc conçu cette introduction pour être informative et permettre à ceux qui auront à poursuivre mon travail (Laure-Anne notamment) de gagner un peu de temps. Je suis conscient de la longueur de cette introduction, mais je n'aurais pas eu l'impression de faire un travail sérieux sans cela. La multiplicité des journaux scientifiques nous fait parfois passer à côté d'informations utiles et j'ai pensé que la rédaction de la thèse était une des très rares occasions de tendre à l'exhaustivité.

Au laboratoire de Michel Labouesse, nous nous intéressons à la mise en place et aux processus de maintien de la polarité des cellules épithéliales chez le nématode *C. elegans*. Cette thématique générale est déclinée de deux façons. Un groupe s'intéresse à l'elongation de l'embryon qui ne repose pas sur des divisions cellulaires mais sur un allongement spectaculaire des cellules épidermiques qui requiert une réorganisation massive du cytosquelette. L'autre groupe, auquel j'appartiens, s'intéresse au trafic cellulaire apical dans les cellules épithéliales des larves et de l'adulte. Ce trafic est particulièrement intense et complexe au niveau de l'épiderme, qui sécrète la cuticule du ver de façon cyclique à chaque mue larvaire. On verra qu'il existe différents systèmes de sécrétion apicale dans l'épiderme, et que l'un d'eux en particulier dépend d'un complexe protéique vital des eucaryotes : la V-ATPase, ou plus justement de son secteur V0.

J'ai organisé ce manuscrit de façon classique, en trois grandes parties : introduction, résultats, discussion.

L'introduction a été subdivisée en quatre parties. Mon travail ayant consisté à analyser une voie de sécrétion et à trouver les compartiments et les protéines qui y sont impliquées, je présente dans un premier temps la compartimentation cellulaire dans la voie de biosynthèse protéique et la régulation des échanges intercompartiments dans ce contexte. Ayant travaillé sur les étapes tardives de la sécrétion apicale, dans une seconde sous-partie, j'aborde les compartiments terminaux de la sécrétion et leurs relations avec la voie endolysosomale dans le cadre de la sécrétion polarisée. Mon modèle d'étude étant les epithelia de *C. elegans*, j'ai ensuite introduit ce modèle d'étude. Enfin, j'ai consacré une partie consistante de cette introduction à la présentation de la pompe ATPase

vacuolaire à protons (V-ATPase). C'est en effet l'étude de mutants d'une sous-unité « a » de ce complexe qui nous a permis de mettre en évidence la nouvelle voie de sécrétion présentée ici.

Le second chapitre de ma thèse est composé de deux articles que j'ai introduits puis résumés, et de résultats non publiés que j'ai générés en tentant de comprendre davantage la sécrétion apicale dans l'épiderme de *C. elegans*. Le premier article (soumis) décrit essentiellement les mutants isolés lors d'un crible pour des défauts de sécrétion et d'osmorégulation, et met en relief un lien entre ces deux processus, à travers deux mutants : *vha-5* (le gène *vha-5* code une sous-unité « a » du secteur V0 de la V-ATPase) et *rdy-2* (le gène *rdy-2* code une tétraspanine non conventionnelle spécifique des nématodes). Le second article (publié) présente la suite de l'étude de VHA-5, et la mise en évidence de sa participation à deux fonctions distinctes de la V-ATPase : l'une spécifique de V0 pour la sécrétion, et l'autre dépendant de la V-ATPase complète pour l'osmorégulation. Cet article révèle également une voie de sécrétion apicale impliquant des exosomes contenant des protéines de type Hedgehog. Ensuite, je présenterai les travaux que j'ai réalisés en parallèle (caractérisation du gène de la syntaxine 2 de *C. elegans*) où à l'issue de ce second article (crible ARNi ciblé, étude du lien entre la voie de sécrétion par les exosomes et la réponse immunitaire innée chez *C. elegans*), pour tenter de trouver d'autres protéines impliquées dans la sécrétion apicale et la voie que nous avons découverte.

Enfin, concernant la discussion, je m'y suis concentré sur les trois questions pour lesquelles j'avais le plus d'éléments. Je reviens donc sur les rôles de la V-ATPase dans les différents tissus où *vha-5* est exprimé. Je traite ensuite de la « signalisation Hedgehog » chez *C. elegans*. Enfin, je suis revenu sur la composition et le(s) rôle(s) potentiel(s) des corps multivésiculaires et des exosomes chez *C. elegans*.

PARTIE I - INTRODUCTION

1 COMPARTIMENTATION CELLULAIRE EUCHAROTE ET SYNTHESE PROTEIQUE.....	12
1.1 LES COMPARTIMENTS DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES PROTEINES SECRETES..	12
1.1.1 <i>Caractéristiques des cellules eucaryotes et compartmentation cellulaire.....</i>	12
1.1.2 <i>Les cellules eucaryotes sécrètent des protéines.....</i>	14
1.1.3 <i>Le réticulum endoplasmique (RE).....</i>	15
1.1.4 <i>Compartiment(s) intermédiaire(s) RE-Golgi (ERGIC).....</i>	16
1.1.5 <i>L'appareil de Golgi.....</i>	17
1.1.6 <i>Le réseau transgolgien (TGN)</i>	20
1.2 REGULATION ET DETERMINISME DES ECHANGES INTER-COMPARTIMENTS.....	21
1.2.1 <i>Les échanges intercompartiments impliquent des vésicules.....</i>	22
1.2.2 <i>Rôle des petites GTPases, de la vésiculogenèse à l'adressage vésiculaire.....</i>	24
1.2.3 <i>Les facteurs d'arrimage vésiculaires.....</i>	28
1.2.4 <i>Une spécificité de fusion grâce aux protéines SNAREs ?.....</i>	32
1.2.5 <i>Tri et évolution de la composition membranaire.....</i>	36
1.2.6 <i>Importance des modifications post-traductionnelles, et des hélices peptidiques lipophiles.....</i>	39
2 SECRETION ET ENDOCYTOSE DANS LES CELLULES POLARISEES : QUELLES RELATIONS ?	41
2.1 TRAFIC INTRACELLULAIRE ORIENTE ET POLARITE.	41
2.1.1 <i>Considérations générales.....</i>	41
2.1.2 <i>La cellule eucaryote est un système « polarisé » par nature.....</i>	42
2.1.3 <i>Qu'appelle-t-on cellules polarisées ?.....</i>	42
2.1.4 <i>Les déterminants apicaux et basolatéraux dans la sécrétion polarisée.</i>	45
2.2 LES COMPARTIMENTS DE LA VOIE ENDOCYTOTIQUE.....	50
2.2.1 <i>Les vésicules d'endocytose.....</i>	51
2.2.2 <i>Diversité des endosomes.....</i>	53
2.2.3 <i>Les lysosomes.....</i>	57
2.2.4 <i>Modes alternatifs d'internalisation de composés extracellulaires</i>	58
2.3 LES COMPARTIMENTS TERMINAUX DE LA SECRETION PROTEIQUE ET LES MODALITES D'EXOCYTOSE.	59

2.3.1	<i>Les vésicules de sécrétion : fusion régulée complète et « kiss-and-run ».....</i>	59
2.3.2	<i>Les granules de sécrétion : une sécrétion régulée lente ou « kiss-and-coat »... </i>	60
2.3.3	<i>Les lysosomes sécrétoires (LSSs).....</i>	61
2.3.4	<i>Corps multivésiculaires (CMVs) et exosomes.</i>	63
3	LE MODELE D'ETUDE : LA SECRETION APICALE DE LA CUTICULE DE <i>C. ELEGANS</i> PAR L'EPIDERME.....	70
3.1	<i>C. ELEGANS, ORGANISME MODELE EN BIOLOGIE.....</i>	70
3.1.1	<i>Classification.....</i>	70
3.1.2	<i>Généralités anatomiques.....</i>	71
3.1.3	<i>Le génome de <i>C. elegans</i>.....</i>	72
3.1.4	<i>Développement et cycle de vie de <i>C. elegans</i>.....</i>	72
3.2	<i>LES EPITHELIA CHEZ C. ELEGANS</i>	73
3.2.1	<i>Que sont les epithelia chez <i>C. elegans</i> ?</i>	73
3.2.2	<i>Le lignage épithelial chez <i>C. elegans</i>.</i>	74
3.2.3	<i>La cellule excrétrice.</i>	75
3.2.4	<i>Les organes chimiosensoriels.</i>	76
3.2.5	<i>Les deux syncytia de l'épiderme majeur : « hyp7 » et « seam ».</i>	77
3.3	<i>LA CUTICULE DE C. ELEGANS</i>	78
3.3.1	<i>Morphologie et structure.....</i>	78
3.3.2	<i>Composition.....</i>	79
3.3.3	<i>Fonctions de la cuticule.</i>	81
3.3.4	<i>Une sécrétion cyclique de la cuticule.....</i>	83
4	L'ATPASE VACUOLAIRE A PROTONS, UN COMPLEXE PROTEIQUE ESSENTIEL DES EUKARYOTES.....	84
4.1	<i>FONCTIONNEMENT DE L'ATPASE VACUOLAIRE.</i>	84
4.1.1	<i>Généralités sur les ATPases.</i>	84
4.1.2	<i>Structure de l'ATPase vacuolaire à protons (H+-V-ATPase).</i>	85
4.1.3	<i>Assemblage du complexe V-ATPase.</i>	86
4.1.4	<i>L'association fonctionnelle complémentaire de V1 et de V0 : comment coupler l'hydrolyse de l'ATP au transport de protons.</i>	89
4.2	<i>FONCTIONS CELLULAIRES DE LA V-ATPASE.</i>	92
4.2.1	<i>Maladies dans lesquelles la V-ATPase est impliquée.</i>	93
4.2.2	<i>La création d'un différentiel de pH utilisable comme force motrice.</i>	93
4.2.3	<i>La V-ATPase dans la voie endolysosomale.</i>	96

4.2.4	<i>L'acidification des organites sécrétoires.</i>	98
4.2.5	<i>L'acidification de la matrice extracellulaire.</i>	99
4.3	ADRESSAGE ET REGULATION DE LA V-ATPASE	100
4.3.1	<i>Régulation de l'association V₁-V₀.</i>	101
4.3.2	<i>Régulation de l'activité de la V-ATPase sans dissociation du complexe.</i>	104
4.3.3	<i>Interactions avec la V-ATPase : rôles dans l'adressage et la régulation du complexe ?</i>	106
4.3.4	<i>Redondance génétique des sous-unités et diversité des complexes V-ATPase.</i>	
	109	
4.4	CE N'EST PAS TOUJOURS LA POMPE QUI COMPTE	114
4.4.1	<i>V-ATPase et vésiculogenèse.</i>	115
4.4.2	<i>L'activité de la V-ATPase est importante pour le trafic cellulaire.</i>	115
4.4.3	<i>Des rôles de certaines sous-unités indépendamment de leur participation à la pompe ?</i>	116
4.4.4	<i>Rôle indépendant du secteur V₀ dans la fusion membranaire et la sécrétion..</i>	117

PARTIE II - RESULTATS

1 DES GENES IMPLIQUES DANS L'OSMOREGULATION ET LA SECRETION CHEZ <i>C. ELEGANS</i>.....	122
1.1 PRESENTATION DE L'ARTICLE 1	122
1.1.1 <i>Contexte de l'étude</i>	122
1.1.2 <i>Obtention de 8 allèles conférant le phénotype Rdy et définissant 5 groupes de complémentation</i>	123
1.1.3 <i>Une sous-unité de V-ATPase requise dans les cellules épithéliales pour la sécrétion et/ou l'osmorégulation</i>	124
1.1.4 <i>Quels rôles pour les autres RDYs ?</i>	125
1.2 ARTICLE 1 : « GENES REQUIRED FOR OSMOREGULATION AND APICAL SECRETION IN CAENORHABDITIS ELEGANS »	127
2 ROLE DU SECTEUR V0 DE LA V-ATPASE DANS LA SECRETION EPIDERMIQUE APICALE.	128
2.1 PRESENTATION DE L'ARTICLE 2	128
2.1.1 <i>Contexte initial de l'étude</i>	128
2.1.2 <i>Les mutations de vha-5 affectent deux fonctions biochimiques distinctes : la fonction de pompe à protons de la V-ATPase, et une fonction spécifique du secteur V0 indépendante de V1.</i>	128
2.1.3 <i>Investigation de la fonction de V0 dans la sécrétion</i>	130
2.2 ARTICLE 2 : « THE V0-ATPASE MEDIATES APICAL SECRETION OF EXOSOMES CONTAINING HEDGEHOG-RELATED PROTEINS IN CAENORHABDITIS ELEGANS »	134
3 A LA RECHERCHE DE NOUVEAUX ACTEURS DE LA SECRETION EPIDERMIQUE APICALE.....	135
3.1 QUELLES SONT LES SYNTAXINES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE EPIDERMIQUE ? 135	135
3.1.1 <i>Introduction</i>	135
3.1.2 <i>Les séquences protéiques des syntaxines associées à la membrane plasmique ségrégent ensemble</i>	136
3.1.3 <i>Les syntaxines étudiées présentent une spécificité d'expression tissulaire.</i>	137
3.1.4 <i>Obtention du mutant syn-2(mc45)</i>	138

3.2 UN LIEN PROBABLE AVEC LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE CHEZ <i>C. ELEGANS</i>...	144
3.2.1 <i>Point de départ</i>	144
3.2.2 <i>Les mutants che-14(ok193) sont hypersensibles à l'infection par Drechmeria coniospora.</i>	144
3.2.3 <i>Les mutants hypomorphes de sécrétion de vha-5 sont aussi hypersensibles à l'infection par D. coniospora.</i>	145
3.2.4 <i>Quelques perspectives.</i>	146
3.3 UN CRIBLE ARNI CIBLE POUR RECHERCHER DE NOUVEAUX ACTEURS DE LA VOIE DE SECRETION IDENTIFIEE.	147
3.3.1 <i>Définition du cible.</i>	147
3.3.2 <i>Résultats du cible.</i>	149

PARTIE III - DISCUSSION

1 ROLES DE V0 ET DE LA V-ATPASE CONTENANT VHA-5 CHEZ C. ELEGANS.	154
1.1 A QUAND REMONTE LE DOUBLE JEU DE V0 ?	154
1.1.1 <i>La double fonction de V0 est conservée.....</i>	154
1.2 ROLES DE V0 ET DE LA V-ATPASE DANS LES CELLULES GAINES DES ORGANES CHIMIOSENSORIELS.....	156
1.2.1 <i>Indices d'une sécrétion affectée ?</i>	156
1.2.2 <i>L'osmorégulation est peut-être plus affectée.....</i>	157
1.3 ROLES DE V0 ET DE LA V-ATPASE DANS LE SYSTEME EXCRETEUR.	159
1.3.1 <i>Un rôle évident dans l'osmorégulation.....</i>	159
1.3.2 <i>Un rôle mineur dans la sécrétion ?</i>	159
1.4 ROLES DE V0 ET DE LA V-ATPASE DANS L'EPIDERME.	160
1.4.1 <i>Rôle osmorégulateur.</i>	160
1.4.2 <i>Rôle sécrétoire.....</i>	160
1.4.3 <i>Importance au cours des mues.</i>	161
1.4.4 <i>Un scenario explicatif des fonctions de V0 et V1 lors des mues.</i>	162
1.5 UN ROLE DE LA V-ATPASE DANS L'ELONGATION ?	163
2 INVESTIGATION DE LA « SIGNALISATION HEDGEHOG » CHEZ C. ELEGANS.	165
2.1 SPECIFICITE APICALE DE LA SECRETION DES WARTHOG ?	165
2.1.1 <i>Sécrétion polarisée des protéines de type Hedgehog (HRPs).</i>	165
2.1.2 <i>Des modifications post-traductionnelles sont probablement requises pour la fonction des HRPs chez C. elegans.</i>	165
2.1.3 <i>Perspectives expérimentales.....</i>	166
2.2 TRANSPORT ET DISPERSION DES HRPs.....	166
2.2.1 <i>Comment est réalisé le transport des protéines de type Hedgehog ?.....</i>	166
2.2.2 <i>Rôle(s) de Dispatched/CHE-14.</i>	167
2.3 PROTEINES HEDGEHOG (HRPs) ET SIGNALISATION : QU'EN EST-IL CHEZ C. ELEGANS ?	168
2.3.1 <i>Rôle conservé des héparane-sulfate co-polymérases ?.....</i>	169

2.3.2	<i>L'association HRP-récepteur pourrait être conservée chez C. elegans.</i>	169
2.3.3	<i>Etudier les patrons d'expression spatio-temporelle des HRPs et de leurs récepteurs.....</i>	170
2.3.4	<i>Les HRPs agissent-elles de façon « cellule-autonome » ?</i>	170
2.3.5	<i>Existe-t-il une voie de transduction d'un signal de type Hedgehog chez C. elegans ?.....</i>	171
2.3.6	<i>A quoi sert la relation HRPs / PTRs ?.....</i>	172
3	POURQUOI UNE SECRETION APICALE D'EXOSOMES CHEZ C. ELEGANS ?.....	175
3.1	QUELLE EST LA NATURE DES CMVs ?	175
3.1.1	<i>Les différents CMVs.</i>	175
3.1.2	<i>Composition des CMVs.</i>	176
3.1.3	<i>Formation de ces CMVs ?</i>	177
3.2	ROLES DES EXOSOMES.....	177
3.2.1	<i>Exosomes et biogenèse de la cuticule.</i>	177
3.2.2	<i>Un rôle des exosomes dans l'immunité innée ?</i>	178
3.2.3	<i>Un rôle développemental des exosomes ?.....</i>	178

PREMIERE PARTIE :

INTRODUCTION – CONTEXTE DE L'ETUDE.

- 1) Compartimentation cellulaire eucaryote et synthèse protéique.
- 2) Sécrétion, voie endolysosomiale, et recyclage membranaire : quelles relations ?
- 3) Le modèle d'étude : la sécrétion apicale de la cuticule par l'épiderme de *Caenorhabditis elegans*.
- 4) L'ATPase vacuolaire à protons, un complexe protéique essentiel des eucaryotes.

1 Compartimentation cellulaire eucaryote et synthèse protéique.

1.1 Les compartiments de la voie de biosynthèse des protéines sécrétées.

Après une brève introduction sur la cellule eucaryote, j'ai choisi de me cantonner aux aspects les mieux établis et les plus précoces de la voie de sécrétion, de la synthèse au tri protéique. Le trafic au niveau des compartiments endosomaux sera abordé dans la deuxième partie de cette introduction. Dans un premier temps j'ai décrit les compartiments impliqués et certains de leurs rôles, comme la modification de protéines sécrétées par des sucres ou des lipides. Ensuite j'ai insisté sur les facteurs qui régulent les échanges entre compartiments, principalement au cours des processus de vésiculogenèse et d'adressage. En effet, la hiérarchisation des rôles de ces facteurs est peu claire d'une revue à l'autre, notamment leur contribution à la spécificité des échanges. Ce problème est important lorsqu'on est confronté à des processus de trafic polarisé, comme celui que j'ai étudié durant ma thèse. Dans la mesure du possible, j'illustrerai cette partie par des images de microscopie électronique prises après cryofixation à haute pression sur des adultes *C. elegans* de type sauvage (réalisée avec l'EMPACT2 disponible au laboratoire de Patrick Schultz à l'ESBS, et avec la contribution déterminante de Yannick Schwab à l'IGBMC).

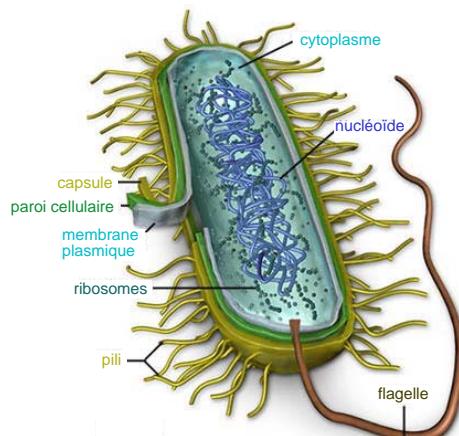
1.1.1 Caractéristiques des cellules eucaryotes et compartimentation cellulaire.

1.1.1.1 La cellule eucaryote est compartimentée.

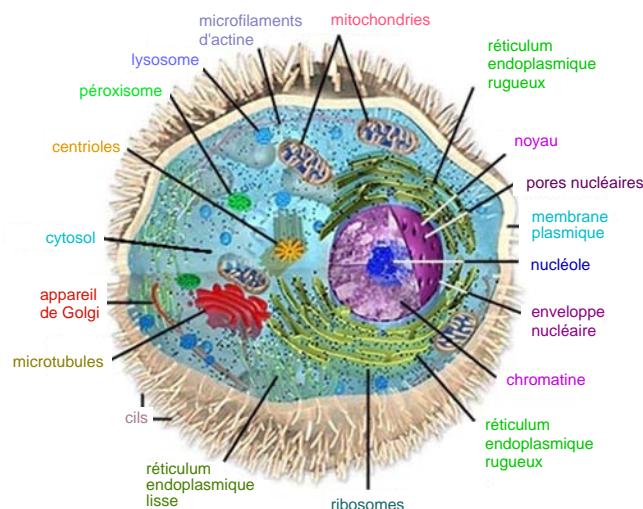
Les êtres vivants cellulaires sont actuellement classés en trois empires sur les bases de leur organisation et composition cellulaires, et de la séquence de l'ARN ribosomique de la petite sous-unité ribosomale : eubactéries, archaebactéries, et eucaryotes (Figure 1C). Les deux premiers empires sont des procaryotes, c'est-à-dire que ce sont des cellules non compartimentées, dont l'information génétique, portée par une ou plusieurs chaînes d'acide désoxyribonucléique (ADN) répartie(s) et compactée(s) sur un ou plusieurs chromosome(s)

Figure 1. PROCARYOTE ET EUKARYOTES

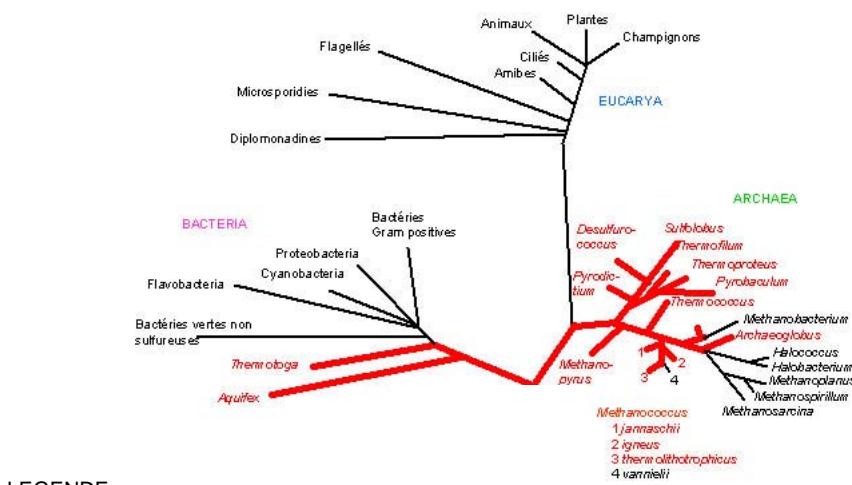
A Schéma d'eubactérie.



B Schéma d'eucaryote.



C Les trois empires d'après la phylogénie de l'ARNr 16S.



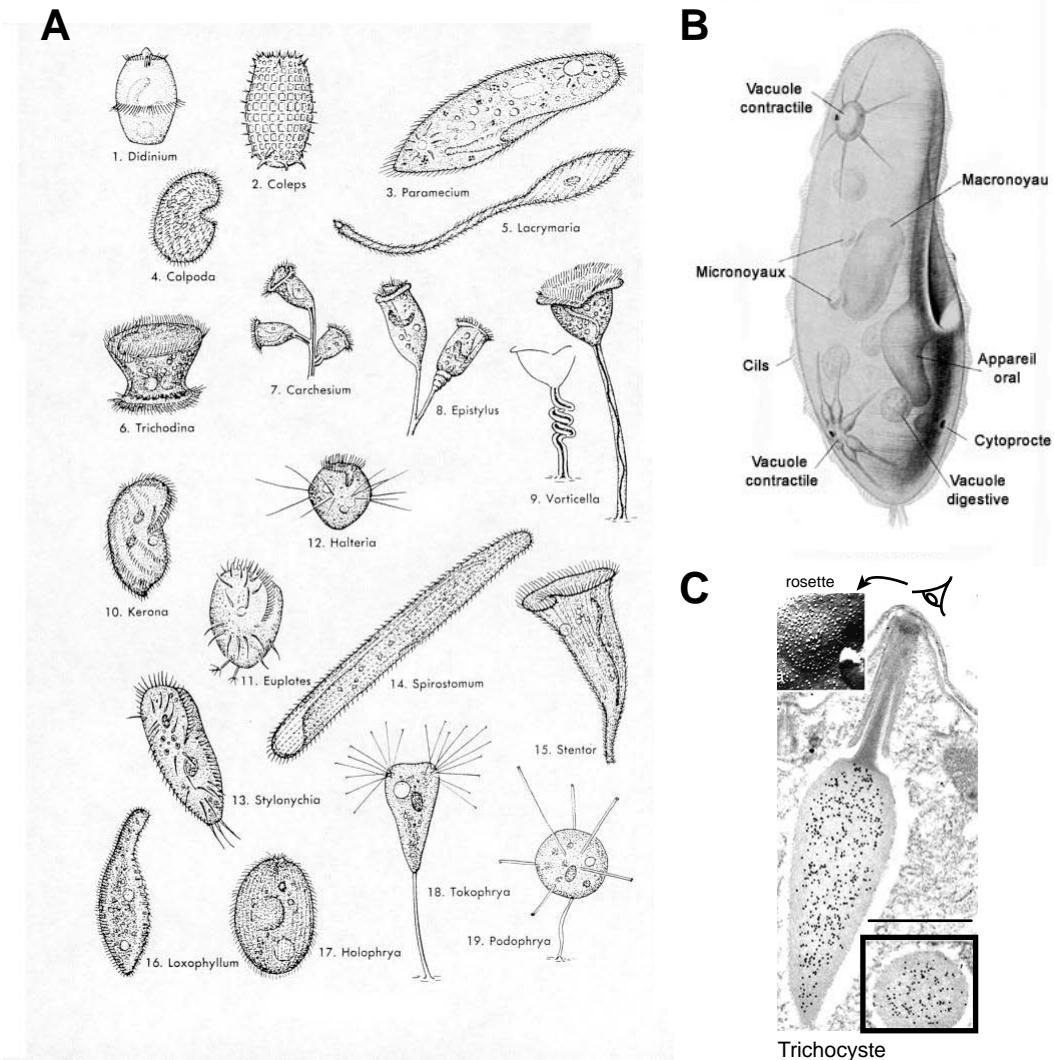
LEGENDE.

A : Schéma simplifié non exhaustif d'une eubactérie flagellée. Les procaryotes comme cette bactérie ne possèdent pas de compartiments intracellulaires. Les ribosomes sont libres dans le cytoplasme ainsi que le génome même s'il est regroupé sous la forme d'un nucléoïde.

B : Schéma simplifié non exhaustif d'une cellule eucaryote ciliée de type zoaire (sans plastides). La chromatine contenant le génome est contenue dans un noyau doté d'une enveloppe nucléaire. Cette cellule comporte différents compartiments intracellulaires : réticulums endoplasmiques, Golgi, lysosomes, peroxysores, mitochondries, et des organites non membranueux comme les centrioles et les cils. Les ribosomes sont associés au réticulum endoplasmique pour former le réticulum endoplasmique granuleux. Un cytosquelette complexe parcourt la cellule et tapisse la membrane sur sa face interne (microtubules et microfilaments d'actine).

C : Phylogénie des trois empires : archaebactéries/archaea - eubactéries/bacteria - eucaryote/eucarya d'après les comparaisons de séquences nucléotidiques de l'ARN 16S de la petite sous-unité du ribosome. En rouge sont représentés les procaryotes extrémophiles thermophiles.

Figure 2. DIVERSITE DES CILIES ET COMPARTIMENTS PARTICULIERS



LEGENDE.

A : Diversité de formes chez les protozoaires : exemple des ciliés.

B : Les ciliés possèdent des compartiments particuliers. En premier lieu, ils possèdent deux noyaux (Macro- et Micronoyau). Ils présentent également des organes de type vacuole particuliers requis pour l'osmorégulation et appelés vacuoles contractiles. Ils possèdent également des orifices particuliers : cytostome et cytoprocte qui miment une bouche et un anus. Comme leur nom l'indique ils possèdent différents cils locomoteurs, ou leur permettant d'amener leur nourriture jusqu'à leur "bouche". Ils disposent également d'un organite de type granule de sécrétion appelé trichocyste.

C : Trichocyste en coupe longitudinale (D'après Vayssié et coll. 2001), et transversale (en bas à droite). Cet organite est sécrété de façon régulée par le calcium. Le site de fusion avec la membrane plasmique présente une structure protéique en rosette (en haut à gauche) correspondant peut-être à des SNAREs ou à des sous-unités de V-ATPase (barre d'échelle 1 µm).

linéaires ou circulaires (Figure 1A), est libre dans le cytosol (sauf exception Annexe 1). A l'inverse, l'ADN des cellules eucaryotes est contenu dans un compartiment entouré d'une membrane de structure complexe (Figure 1B) qui définit le noyau de la cellule et appelée enveloppe nucléaire (eucaryote = véritable noyau). D'autre part les cellules eucaryotes ont considérablement complexifié leur compartimentation que ce soit chez les unicellulaires (Figure 2) ou à l'occasion de la diversification des types cellulaires chez les organismes pluricellulaires (végétaux et animaux) (Annexe 5). De plus, la grande majorité des eucaryotes contient des organites dits semi-autonomes (mitochondries – Annexe 2 et 3, hydrogénosomes – Annexe 1, plastes variés – Annexe 4, etc.) car pourvu d'un génome indépendant, rappelant sous bien des aspects des procaryotes. A souligner par ailleurs, les eucaryotes sont les seuls (jusqu'à preuve du contraire) à être capable d'endocytose et de phagocytose (nous reparlerons plus loin de ces processus).

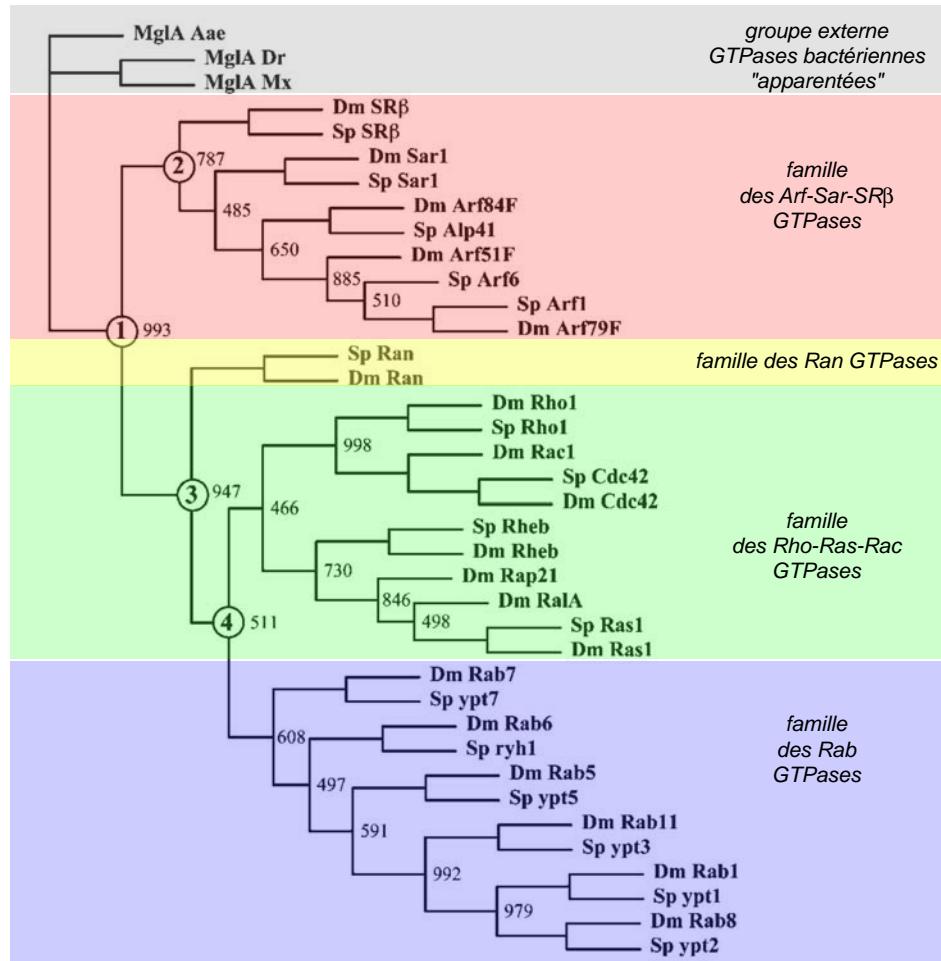
1.1.1.2 Les eucaryotes possèdent des machineries moléculaires spécifiques.

En dehors de ces grands traits qui distinguent eucaryotes de procaryotes, la compaction de l'ADN au niveau chromosomique repose dans une écrasante majorité sur l'utilisation de protéines de compaction appelée histones chez les eucaryotes, protéines inexistantes chez les procaryotes bien qu'il en existe des analogues chez les archaebactéries. Ensuite certaines machineries cellulaires, telles celle responsable de la duplication du génome cellulaire lors des divisions cellulaires conduisant à la reproduction de la cellule, sont communes entre les eucaryotes et les archaebactéries mais diffèrent radicalement chez les eubactéries qui à cela près partagent de nombreux points communs avec les archaebactéries. Parmi d'autres spécificités, l'une des plus importantes est certainement la possession d'un véritable cytosquelette plutôt que d'une paroi cellulaire (comme c'est le cas chez les procaryotes), et qui permet entre autres processus inconnus des procaryotes, la mitose. Enfin, les diverses petites GTPases qui régulent le fonctionnement du cytosquelette et le trafic membranaire, est une autre spécificité des eucaryotes (Jekely 2003).

1.1.1.3 Phylogénie des petites GTPases et compartimentation.

Les petites GTPases (« Guanosine-TriPhosphate hydrolases ») des eucaryotes sont de petites protéines monomériques de 20 à 30 kD initialement découvertes du fait de leur implications dans les cancers induits par les virus de sarcomes (Shih, Williams et al. 1978; Der, Krontiris et al. 1982; Parada, Tabin et al. 1982). De la levure à l'homme plus d'une centaine d'entre-elles ont été identifiées depuis.(Bourne, Sanders et al. 1990; Takai, Sasaki

Figure 3. PHYLOGENIE DES PETITES GTPASES.



LEGENDE.

Phylogénie des petites GTPases de levure (Sp) et de drosophile (Dm) par la méthode du voisin le plus proche sur la base des séquences protéiques. Chaque embranchements (1 à 4) correspond à l'apparition d'une nouvelle famille de GTPases (D'après Jekely 2003).

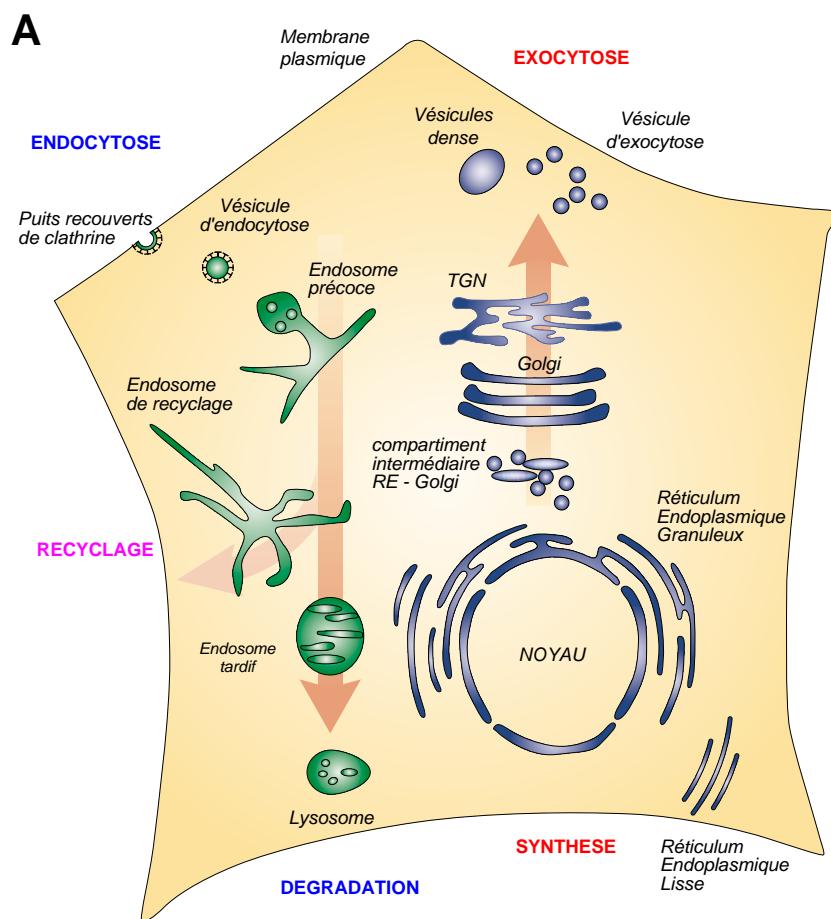
et al. 2001). Ce sont des protéines régulatrices de l'expression génique, du cytosquelette, du transport nucléo-cytoplasmique et du trafic vésiculaire, qui oscillent entre un état actif lié au GTP et inactif lié au GDP.

L'étude de la phylogénie des petites GTPases (Jekely 2003) a permis de déterminer que le dernier ancêtre des eucaryotes possédait déjà les mêmes grandes familles de GTPases (Sar1, Arf, SR β , Ran, Rab, Ras, Rho), ce qui suppose que la diversification des GTPases se soit produite avant la diversification des eucaryotes actuels. D'autre part ces sept familles de GTPases typiquement eucaryotes sont plus proches entre elles que d'aucune GTPase procaryote. La diversification des GTPases aurait donc été concomitante avec la mise en place de la compartimentation cellulaire eucaryote. Sachant l'importance des petites GTPases dans la régulation du trafic membranaire et des processus métaboliques cellulaires, leur phylogénie est un bon traceur de l'évolution des fonctions cellulaires des eucaryotes. L'une des implications les plus intéressantes de cette hypothèse serait que contrairement à ce qui est intuitif et généralement admis, plutôt que la machinerie de phagocytose, ce serait celle de l'exocytose qui aurait permis la mise en place des premières endomembranes (Jekely 2003). La phagocytose ne serait intervenue que dans un second temps pour permettre l'endosymbiose mitochondriale etc. En effet, la phylogénie des petites GTPases eucaryotes aurait d'abord ségrégué des GTPases de types Sar1, Arf, SR β dont les rôles sont associés aux endomembranes sécrétaires. Par contre, les GTPases de types Rho, Ras, Rab, qui sont essentielles à la phagocytose, ne seraient apparues qu'après trois événements phylogénétiques (Figure 3). Parmi d'autres arguments en faveur de cette hypothèse, la GTPase Sar1 de levure est capable de complémenter la GTPase bactérienne (de type et d'origine plus anciens que les GTPases eucaryotes) MglA de *Myxococcus* (Hartzell 1997), contrairement à Ras. Jekely propose donc un modèle assez parcimonieux et élégant d'apparition de la compartimentation eucaryote, qui a l'avantage d'intégrer la mise en place du cytosquelette (Annexe 6). De façon intéressante, ce modèle suggère une apparition du noyau cellulaire subséquente à celle des endomembranes sécrétaires, mais antécédente à celle de la phagocytose puisque la ségrégation de la famille Ran (essentielle à la régulation du transport nucléaire) aurait précédé celle des Rho, Ras et Rab, contredisant certaines thèses endosymbiotiques (Mans, Anantharaman et al. 2004).

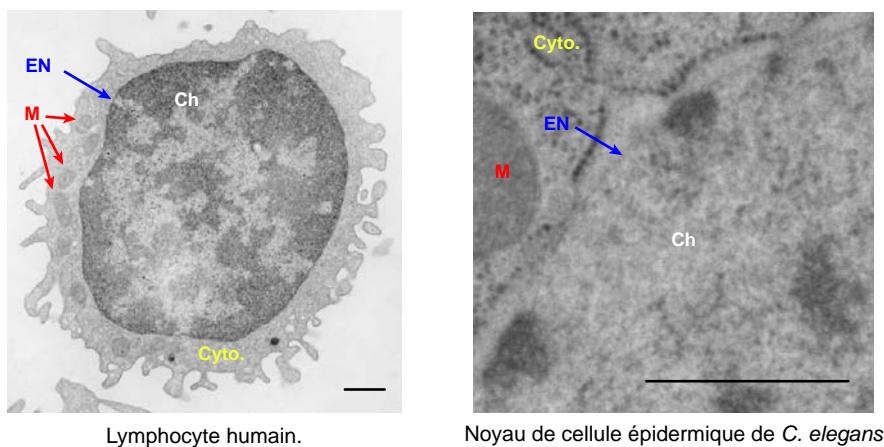
1.1.2 Les cellules eucaryotes sécrètent des protéines.

Les cellules émettent des signaux peptidiques pour communiquer entre elles (hormones, phéromones, neuromédiateurs, morphogènes, signaux de stress), mais aussi des enzymes (trypsine, lipases, metalloprotéases, amylases) et des protéines structurales (kératines,

Figure 5. LA CELLULE EUCARYOTE ET LES COMPARTIMENTS DU TRAFIC INTRACELLULAIRE



B Le noyau cellulaire.



LEGENDE.

A : Schéma simplifié de la cellule et de ses compartiments de la voie de sécrétion et d'endocytose.

B : Noyau cellulaire en microscopie électronique à transmission. Le noyau est entouré du cytoplasme (Cyto.), est délimité par une enveloppe nucléaire (EN), et contient la chromatine (Ch) qui présente une densité variable aux électrons selon les régions du noyau. (M : mitochondrie, barres 1 µm).

collagènes) etc. D'autre part, chaque cellule est entourée d'une membrane contenant des déterminants glyco-protéiques et lipido-protéiques caractéristiques (de l'espèce, du type cellulaire etc.), et différentes protéines transmembranaires régulant les échanges entre la cellule et son environnement. Toutes ces protéines qui ne sont pas destinées au cytosol ou aux organites, sont dites sécrétées, même si certaines restent attachées à la membrane plasmique. De leur synthèse à leur sécrétion, elles transitent dans plusieurs compartiments successifs, que je présente ici après un bref rappel sur le noyau cellulaire.

1.1.3 Le réticulum endoplasmique (RE).

1.1.3.1 Morphologie

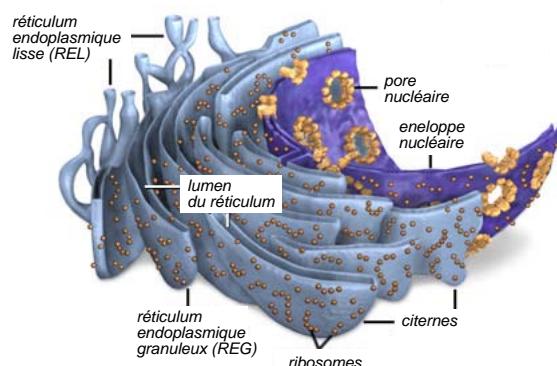
Le réticulum endoplasmique (RE) est un compartiment tubulaire qui prolonge la membrane nucléaire externe (Figure 4 et 5). La composition lipido-protéique de la membrane varie selon les domaines du RE. En particulier, on distingue le RE granuleux (REG, Figure 4) ainsi nommé à cause des ribosomes qui décorent la face externe de sa membrane, et par opposition le RE lisse non associé à des ribosomes (REL, Figure 4).

1.1.3.2 Le Réticulum Endoplasmique Granuleux (REG).

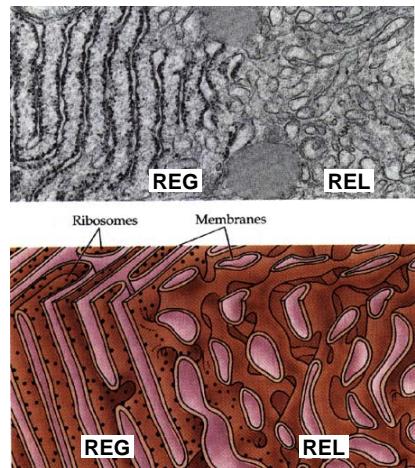
Au niveau des ribosomes du REG a lieu la traduction des ARNm en protéines, pour les protéines des endomembranes cellulaires ou destinées à la voie de sécrétion. Initialement les ribosomes ne sont pas attachés au RE. L'ARNm d'une protéine pourvue d'un peptide signal (SP : « Signal Peptide », cas des protéines sécrétées et membranaires) s'associe au ribosome qui initie la traduction. Le peptide signal de 20 à 30 acides aminés codé par la partie N-terminale de la protéine à synthétiser est traduit en premier (Blobel and Dobberstein 1975; Blobel and Dobberstein 1975; Blobel 1980). La traduction s'interrompt, et le SP est reconnu par un complexe protéique cytosolique appelé SRP (pour « Signal Recognition Particle ») qui est à son tour reconnu par un complexe de la membrane du REG appelé SRPR (pour « Signal Recognition Particle Receptor »). Un autre complexe protéique (RR pour « Ribosome Receptor ») reconnaît le ribosome associé, ce qui renforce l'association ribosome/REG. La traduction se poursuit et la protéine immature est « transloquée » et ancrée dans la membrane du REG via son SP (composé d'acides aminés hydrophobes). A la fin de la traduction, après clivage du SP par des enzymes du REG, la protéine immature se retrouve dans le lumen (protéine sécrétée) ou incorporée dans la membrane du REG.

Figure 4. LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE.

A

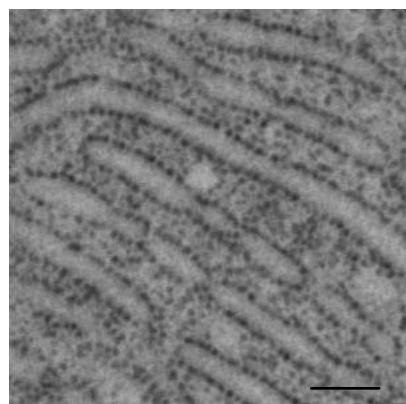


B

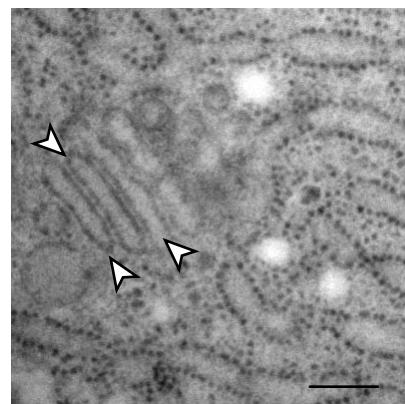


C

Réticulum dans les cellules épidermiques de *C. elegans*



Réticulum Endoplasmique
Granuleux (REG)



Réticulum Endoplasmique
Lisse (REL)

LEGENDE.

A : Schéma du réticulum endoplasmique (RE). Le RE se forme dans la continuité de l'enveloppe nucléaire, présente une partie granuleuse (REG) décorée de ribosomes, et une partie lisse (REL) dépourvue de ribosomes.

B : REG et REL dans une cellule de mammifère et schéma d'interprétation.

C : REG et REL (tête de flèches blanches) dans l'épiderme hyp7 de *C. elegans*, images prises à l'IGBMC (barres 100 nm).

(protéines résiduelles des endomembranes, protéines de la membrane plasmique : protéines d'adhésion, récepteurs transmembranaires, canaux, échangeurs, pompes, etc.) (Annexe 7).

1.1.3.3 Le Réticulum Endoplasmique Lisse (REL).

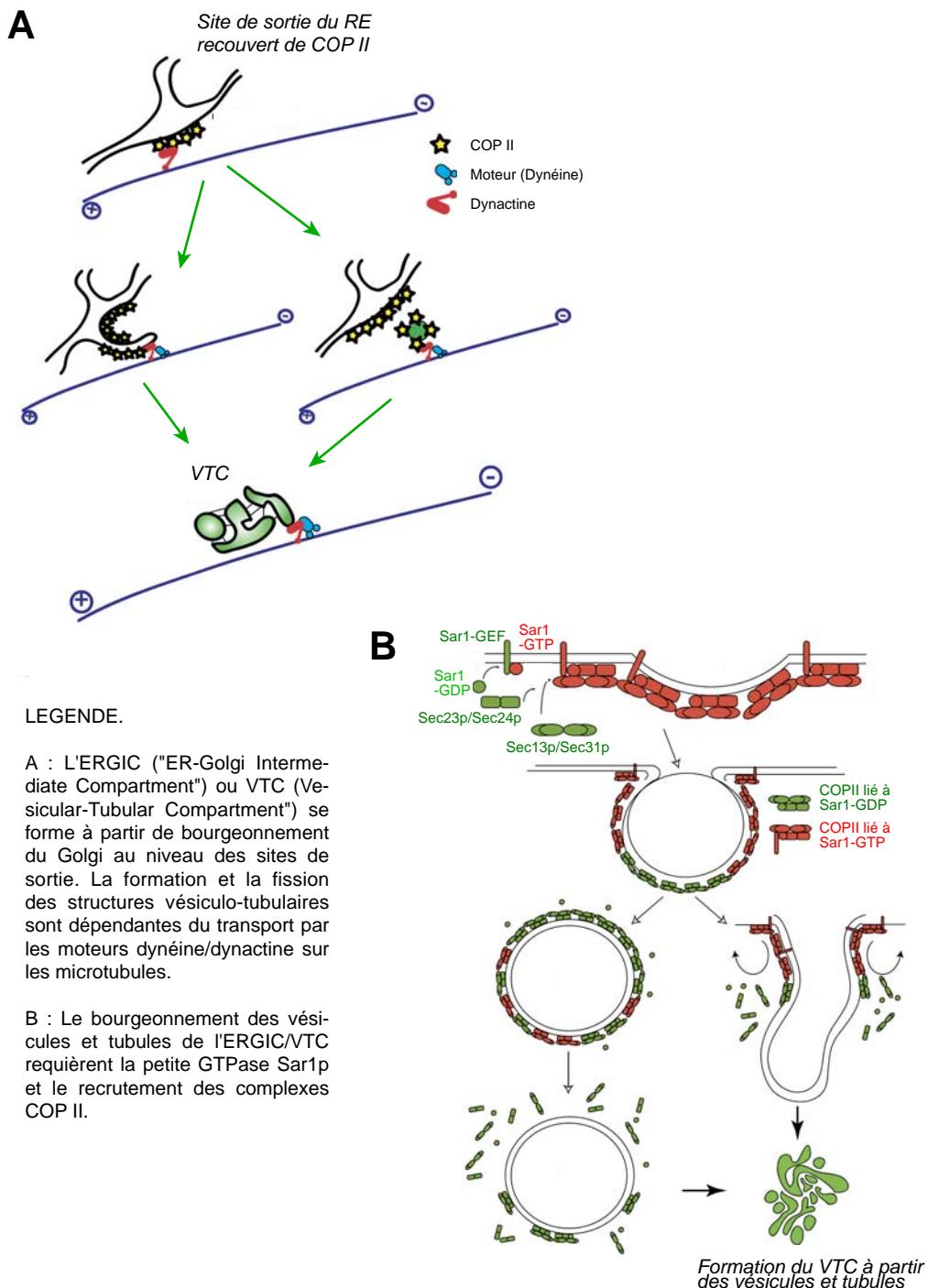
Le REL est quant-à lui le lieu des premières étapes de la maturation protéique et d'un premier contrôle qualité de la synthèse protéique. Entre autres, il contient des protéines chaperonnes qui protègent les nouvelles protéines d'interactions indésirables et qui sont impliquées dans le contrôle de leur repliement (revue par (Barral, Broadley et al. 2004)), ainsi que des enzymes responsables de la création de ponts disulfures (Ellgaard and Ruddock 2005), de glycosylations (Annexe 8A), etc. Si la nouvelle protéine ne satisfait pas au contrôle qualité, un processus appelé réponse de stress du RE ou ERSR (pour « ER Stress Response ») est déclenché pour rediriger les protéines anormales vers la voie de dégradation du protéasome (Meusser, Hirsch et al. 2005) (Annexe 10). Le REL contient aussi des enzymes du métabolisme lipidique et est impliqué dans la biosynthèse de différents lipides et des lipoprotéines comme les chylomicrons (Hussain, Fatma et al. 2005). Il est aussi responsable de certaines étapes de détoxification et de conversion de drogues comme les barbituriques dans le foie des vertébrés.

Dans les cellules animales, les protéines non résiduelles du RE qui ont subi avec succès les premières étapes de contrôle et de maturation sont regroupées dans des sites de sortie du RE (ou ERES : « ER Exit Sites », (Palade 1975)). Des vésicules à manteau COPII (cf. 1.4.1), comportant des transporteurs spécifiques comme p24 (Muniz, Nuoffer et al. 2000) et des lectines comme ERGIC53 (Schweizer, Ericsson et al. 1993; Schrag, Procopio et al. 2003) associés aux protéines cargos, bourgeonnent à partir de ces sites pour être acheminées vers le compartiment intermédiaire RE/Golgi, ou ERGIC (pour « ER-Golgi Intermediate Compartment »)(Schrag, Procopio et al. 2003). En revanche, chez les levures, le bourgeonnement des vésicules COPII a lieu tout le long du RE (Rossanese, Soderholm et al. 1999).

1.1.4 Compartiment(s) intermédiaire(s) RE-Golgi (ERGIC).

Bien que chez la levure le trafic entre le RE et le Golgi semble directement assuré par les vésicules COPII, des compartiments intermédiaires ont été décrits sur des critères morphologiques en microscopie électronique (ME) et fonctionnels, dans des cellules de mammifères (Watanabe and Riezman 2004). Le premier ainsi identifié fut baptisé ERGIC

Figure 6. FORMATION DU COMPARTIMENT INTERMEDIAIRE RE - GOLGI (ERGIC OU VTC)



(pour « ER-Golgi Intermediate Compartment ») et observé dans une lignée cellulaire de rein de hamster BHK-21 (Saraste and Kuismanen 1984). Son existence a été confirmée par des méthodes d'imagerie en temps réel et définie par la présence du marqueur moléculaire ERGIC53 (Ben-Tekaya, Miura et al. 2005). Un autre compartiment intermédiaire RE/Golgi, appelé VTC (pour « Vesicular-tubular Transport Compartment ») a aussi été décrit dans des cellules pancréatiques (Martinez-Menarguez, Geuze et al. 1999). Comme son nom l'indique il consisterait en un réseau de tubules peut-être rattachées au RE et/ou au Golgi et de vésicules transitant entre ces compartiments (Figure 6). La contribution des tubules versus vésicules et la contribution exacte des manteaux COPII au transport ER/Golgi est encore débattue (Watson and Stephens 2005).

1.1.5 L'appareil de Golgi.

1.1.5.1 Découverte.

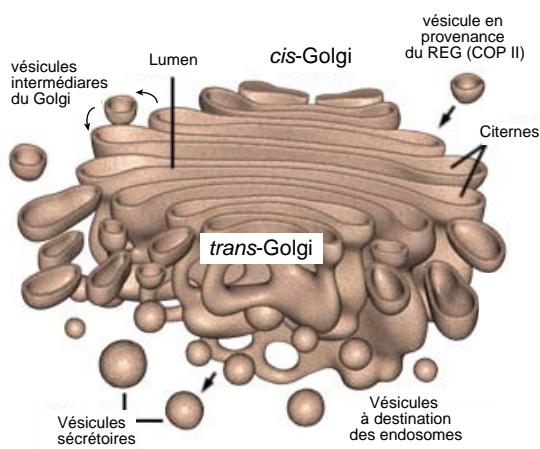
Cet organite porte le nom de son découvreur Camillo Golgi, prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1906. C'était un histologiste-microscopiste du 19^{ème} siècle » siècle qui a développé des colorations cytochimiques pour explorer l'organisation du système nerveux. Il a ainsi découvert en 1898 près du noyau des cellules nerveuses, un nouvel appareil auquel il donna son nom : l'appareil de Golgi, souvent abrégé Golgi. Dans les conditions expérimentales de l'époque, la coloration de cette structure fragile était très délicate et peu reproductible. De plus, il s'agissait du premier organite identifié et l'on ignorait que les cellules contenaient des compartiments membranaires internes autres que le noyau. Ce n'est donc que dans les années 50 que l'ensemble des biologistes fût convaincu de son existence à l'avènement de microscopie électronique qui permit d'observer le Golgi dans tous les types cellulaires (pour revue : (Bentivoglio 1999)).

1.1.5.2 Morphologie.

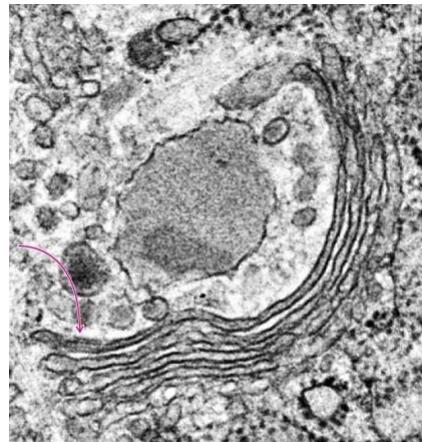
Morphologiquement, le Golgi se présente comme un empilement de saccules aux extrémités desquelles bourgeonnent des vésicules (Figure 7). Il en existe un seul de bonne taille par cellule chez les mammifères, mais plusieurs plus petits chez la levure (Preuss, Mulholland et al. 1992) et dans la plupart des cellules d'invertébrés comme *C. elegans*. Dans le sens dit antérograde, le Golgi est divisé en *cis*-Golgi correspondant au site d'entrée des protéines en provenance du RE et de l'ERGIC, puis en Golgi médian et *trans*-Golgi ou réseau *trans*-golgien (TGN pour « Trans-Golgi Network »), site de sortie des protéines

Figure 7. APPAREIL DE GOLGI

A

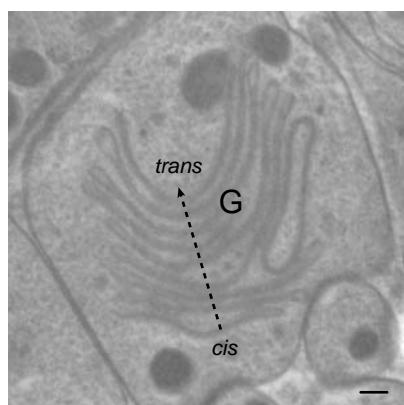


B



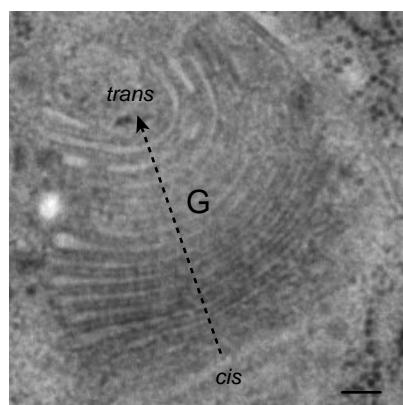
Appareil de Golgi de cellule de vertébre

C



Appareil de Golgi de larve L1 de *C. elegans*

D



Appareil de Golgi d'Adulte *C. elegans*

LEGENDE.

A : Schéma d'appareil de Golgi. Le Golgi est un compartiment formé de citernes empilées d'où bourgeonnent des vésicules intermédiaires permettant un transit intragolgien. De la partie la plus en trans, bourgeonnent des vésicules de sécrétion ou à destination de compartiments endosomaux.

B : Coupe transversale d'appareil de Golgi dans une cellule de vertébré, en MET après fixation chimique.

C, D : Coupes transversales d'appareils de Golgi de cellules épidermiques de *C. elegans*, en MET, après fixation à haute pression à froid, réalisé à l'IGBMC (HPF, barres 100 nm).

matures, et sur lequel je reviendrai dans le point 1.3.6 en raison de ses spécificités fonctionnelles.

1.1.5.3 Maturation du Golgi.

Le paradigme actuel veut que du *cis*- au *trans*-Golgi, une maturation des saccules s'effectue, si bien que leur composition membranaire évolue d'une composition proche de celle du RE, vers une autre proche de celle de la membrane plasmique. Ce processus impliquerait un tri par transport rétrograde des protéines résidentes du Golgi via les tubules qui connectent les saccules golgiens (Trucco, Polishchuk et al. 2004). Des vésicules contenant différents facteurs d'arrimage de type Golgines (Satoh, Wang et al. 2003; Malsam, Satoh et al. 2005; Satoh, Malsam et al. 2005) pourraient également être impliquées dans des phénomènes de tri intra-golgien.

1.1.5.4 Modifications des protéines.

1.1.5.4.1 Ajouts de glucides et modifications de chaînes glucidiques.

Lors de la traversée des citernes golgiennes, les protéines en provenance du RE et destinées à la membrane plasmique ou à l'exocytose subissent diverses modifications post-traductionnelles, principalement des ajouts de glucides ou de lipides.

Les chaînes oligosaccharidiques mises en place par (N)-glycosylation (sur les résidus asparagines, N-glycans) dans le RE ou par (O)-glycosylation (sur les résidus sérines, O-glycans) au niveau du Golgi médian (Annexes 8 et 9) sont ainsi allongées, tronquées, branchées par l'action séquentielle de glycosidases et glycosyl-transférases (Annexe 9) (revue par (Rothman 1994)).

L'ajout de mannose-6-phosphate (M6P) est aussi une modification post-traductionnelle clef pour l'adressage de protéines solubles aux lysosomes (comme les enzymes lysosomales, cf. 2.3.3) La reconnaissance du motif M6P-protéine par des récepteurs cations-dépendants (CD-MPR) ou cations-indépendants (CI-MPR) permet l'incorporation des protéines reconnues dans des vésicules bourgeonnant du TGN et destinées aux lysosomes (Traub and Kornfeld 1997).

1.1.5.4.2 Ajouts de lipides.

Les modifications post-traductionnelles impliquent aussi des lipides qui sont associés à certaines protéines membranaires pour leur conférer des propriétés hydrophobes. Certains acides gras (palmitoyle, myristoyle) sont ainsi ajoutés par acylation (par des acyl-CoA) en N-ter après acétylation du premier résidu (exemples : Hedgehog, « cAMP-dependent kinase

A »). Des isoprénoïdes de la voie de biosynthèse du cholestérol peuvent aussi être ajoutés par prénylation des cystéines situées en C-ter dans des sites consensus CAAX (C : Cystéine, A : résidu aliphatique, X : dernier résidu), comme les groupements farnésyle (cas des protéines Ras, de la sous-unité « g » de la transducine, ou encore de la peroxine PEX19) ou géranyle (cas des sous-unités « γ » des protéines G). De façon plus anecdotique, certaines protéines sont modifiées par le cholestérol (Hedgehog, (Porter, Young et al. 1996; Jeong and McMahon 2002)) ou des dérivés de celui-ci (protéines Warthog de *C. elegans*, chez qui il n'y a pas de cholestérol (Matyash, Entchev et al. 2004)). Enfin, certaines protéines sont ancrées au GPI (GlycosylPhosphatidylInositol) via la phosphoéthanolamine couplée à un tétraholoside (3 mannoses et 1 N-Acetyl-glucose, Annexe 8B). Le GPI avec les (O)- et (N)-glycans permettrait l'association des protéines ainsi modifiées avec des radeaux lipidiques spécifiquement destinés à la sécrétion apicale dont on reparlera plus loin (Alfallah, Jacob et al. 1999; Benting, Rietveld et al. 1999; Fivaz, Vilbois et al. 2002; Sotgia, Razani et al. 2002; Paladino, Sarnataro et al. 2004; Sharma, Varma et al. 2004).

1.1.5.4.3 *Hydroxylations.*

Les hydroxylations s'effectuent sur des lysines (catalyse par des lysyl-hydroxylases) ou des prolines (catalyse par des prolyl-hydroxylases, tétramères PHY-1/PHY-2/(PDI-2)x2 ou (PHY-1(ou2)/PDI-2)x2 chez *C. elegans* (Myllyharju, Kukkola et al. 2002)) et constituent des modifications essentielles des collagènes (Myllyharju and Kivirikko 2004). Ces réactions requièrent la vitamine C comme cofacteur.

1.1.5.4.4 *Autres modifications ponctuelles.*

Certaines protéines (exemples : gastrine, fibrinogène) subissent des sulfatations. La réaction fait intervenir le 3'-phosphoadenosyl-5'-phosphosulfate (PAPS) comme donneur de sulfate. D'autres comme la calmoduline et le cytochrome c subissent une méthylation des lysines (utilise comme groupe donneur la S-adénosyl-méthionine). De nombreuses autres modifications existent, comme l'amidation (dépendante de la vitamine C) en C-ter de certaines hormones peptidiques (exemples : oxytocine, vasopressine), les modifications dépendantes de la vitamine K, les modifications par des métaux (sélénoprotéines), des oxydations (collagènes par exemple), formations de ponts disulfures (c'est encore aussi le cas des collagènes, mais aussi des anticorps et de l'insuline) etc.

1.1.5.5 Clavage.

Enfin, un certain nombre de produits de la traduction qui atteignent le Golgi ne sont que des pro-protéines ou des pré-pro-protéines, qui nécessitent un ou plusieurs clivages pour

acquérir une forme activable ou active. Il en va ainsi de la plus petite protéine : l'insuline. C'est aussi le cas du zymogène sécrété par les cellules des acini pancréatiques, ou encore de Hedgehog dont le clivage est autocatalysé par sa partie C-terminale. Enfin c'est le cas encore une fois des collagènes qui subissent deux séries de clivages en N-ter et C-ter (Myllyharju and Kivirikko 2004).

1.1.6 Le réseau transgolgien (TGN)

1.1.6.1 Morphologie du TGN.

Le TGN est un compartiment tubulo-sacculaire fragmenté, à la suite des citernes golgiennes. Il correspond aux trois derniers saccules (Figure 8), qui sont complètement détachés des précédents (ceux-ci communiquent parfois entre eux par des tubules (Mironov, Beznoussenko et al. 2001)) d'après des études de microscopie électronique en 3D à haut voltage (Ladinsky, Kremer et al. 1994; Ladinsky, Wu et al. 2002; Mogelsvang, Marsh et al. 2004; Polishchuk and Mironov 2004).

1.1.6.2 Le TGN est un compartiment de tri.

Situé à la sortie de la voie de biosynthèse des protéines sécrétées, le TGN reçoit également du matériel en provenance des endosomes par transport rétrograde (Mallard, Tang et al. 2002; Saint-Pol, Yelamos et al. 2004). C'est au niveau du TGN qu'ont lieu la plupart des tris protéiques, bien que ce ne soit pas le seul compartiment impliqué (Griffiths and Simons 1986; Soza, Norambuena et al. 2004; Rodriguez-Boulan and Musch 2005). Différents sous-domaines membranaires y coexistent et permettent l'assemblage de plates-formes protéolipidiques aux destinations variées : lysosomes, endosomes (Folsch, Pypaert et al. 2003), membrane plasmique basale (Simmen, Honing et al. 2002; Yeaman, Ayala et al. 2004) ou apicale, mais aussi les citernes du Golgi médian ou le RE (Rodriguez-Boulan and Musch 2005; Bard and Malhotra 2006). Divers processus sont impliqués dans la définition de ces domaines membranaires. Certains de ces domaines sont couverts de manteau de clathrine, d'autres d'oligomères de cavéolines, et d'autres sont nus et associés à AP-4 (« Adaptator Protein 4 »). Il existe également des radeaux lipidiques (« lipid rafts ») ou DRMs (« Detergent-Resistant Microdomaines »), qui sont des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et glycosphingolipides (Barenholz 2004) et résistants aux détergents, dans lesquels on trouve de nombreuses protéines oligomérisées (Paladino, Sarnataro et al. 2004) destinées à la membrane plasmique apicale (protéines ancrées au GPI –

« GlycosylPhosphatidylInositol » (Paladino, Sarnataro et al. 2004), palmitoylées (Roy, Plowman et al. 2005), N- et O-glycosylées, récepteurs MHC de classe II (Poloso, Muntasell et al. 2004...) (Schuck and Simons 2004). Je reviendrai un peu plus loin sur ces domaines.

Une fois ces domaines spécifiques formés, deux mécanismes interviendraient pour permettre la sortie du TGN. L'un reposera sur la formation de vésicules couvertes de clathrine (seule protéine de manteau détectée au niveau du TGN) pour l'adressage aux endosomes et le transport rétrograde au Golgi médian ou au RE, l'autre impliquerait des transporteurs plus volumineux dont la scission serait régulée différemment de celle des vésicules et n'impliquerait pas de protéines de manteau (Polishchuk, Di Pentima et al. 2003). Les sous-domaines sont en effet constitués à l'extrémité de tubules qui peuvent se détacher du TGN par traction le long des microtubules grâce à des adaptateurs comme AP-1 (Nakagawa, Setou et al. 2000) couplés à des moteurs moléculaires comme les kinésines ou la dynamine (Hirschberg, Miller et al. 1998; Kreitzer, Marmorstein et al. 2000; Polishchuk, Polishchuk et al. 2000). De ces tubules ou du TGN, se formeraient alors des vésicules.

Les vésicules à destination des endosomes et lysosomes se formeraient grâce à l'action des petites GTPases Arf (« ADP ribosylation factor ») (cf. 1.4.3.2) associées aux adaptateurs GGAs (« Golgi-localized, Gamma ear-containing, ADP ribosylation factor-binding proteins ») (Dell'Angelica, Puertollano et al. 2000; Hirst, Lui et al. 2000; Duden 2001; Ghosh and Kornfeld 2004; Pelham 2004), qui recruterait le manteau de clathrine. Les protéines GGAs seraient également impliquées dans le transport rétrograde des endosomes au TGN (Wahle, Prager et al. 2005). Un autre adaptateur appelé AP-1A (« Adaptor Protein 1 ») interviendrait aussi dans la sortie du TGN vers les endosomes, tandis qu'AP-1B en association avec l'exocyste (Sec8 et Exo70 au moins) permettrait l'adressage à la membrane plasmique (Folsch, Pypaert et al. 2003).

1.1.6.3 Le TGN est aussi un lieu de maturation protéique.

Si la plupart des évènements de maturation et modifications post-traductionnelles des protéines sécrétées interviennent avant le TGN, pour les collagènes (je reprends fréquemment cet exemple car ce sont les principaux constituants de la cuticule du ver, cf. 4.3.2.1) qui forment des structures quaternaires, les étapes terminales d'assemblage des fibrilles impliquent les saccules les plus en *trans* du Golgi-médian et le TGN.

1.2 Régulation et déterminisme des échanges inter-compartiments.

Cette partie se concentre essentiellement sur le trafic vésiculaire qui régule les échanges entre les différents organites de la voie de sécrétion protéique. L'idée ici est récapituler les acteurs principaux de l'adressage vésiculaire, pour réaliser sur quoi repose la spécificité observée des échanges intercompartiments.

1.2.1 Les échanges intercompartiments impliquent des vésicules.

1.2.1.1 Comment passer d'un compartiment à l'autre ?

Les compartiments de la voie de sécrétion sont largement disjoints même s'il existe des connexions membranaires entre noyau et RE, RE et ERGIC, et entre certains compartiments terminaux de la voie de sécrétion (dont je parlerai plus loin) et la membrane plasmique via des tubules (cas des cellules MDCK par exemple). Cette discrépance de la cellule en compartiments de compositions lipido-protéiques différentes est caractéristique des eucaryotes et est essentielle la réalisation efficace et régulée des fonctions cellulaires. Préserver l'intégrité de ces organites est donc primordiale pour la cellule. Cependant, au cours de l'élaboration et de la sécrétion des protéines, celle-ci transitent successivement à travers ces compartiments. Pour circonvenir la difficulté de maintenir l'intégrité des compartiments successifs tout en permettant le transit des protéines sécrétées, la cellule utilise souvent des organites d'échange de petite taille, ne pouvant donc pas modifier dramatiquement la composition d'un compartiment « accepteur », mobilisables par le cytosquelette (microtubules, actine) et appelés vésicules. S'il est bien connu et largement représenté, ce n'est pas le seul mode d'échange intercompartiments (j'ai évoqué les tubules des cellules MDCK, il ne faut pas négliger les échanges avec le cytosol, et il existe des compartiments d'échange de grosse taille associés ou pas avec des protéines de manteau qui se forment à la sortie du RE pour transporter le procollagène (Mironov, Mironov et al. 2003), ainsi qu'à la sortie du TGN pour la sécrétion à la membrane plasmique, comme on l'a vu précédemment).

1.2.1.2 Différents compartiments, différentes vésicules.

Les vésicules d'échange ont un diamètre moyen de 50 à 100 nm et possèdent des caractéristiques particulières en terme de composition membranaire, de contenu intraluminal, et de capacité à fusionner avec tel ou tel compartiment, selon leur compartiment d'origine. Elles possèdent un manteau protéique constituant plus ou moins

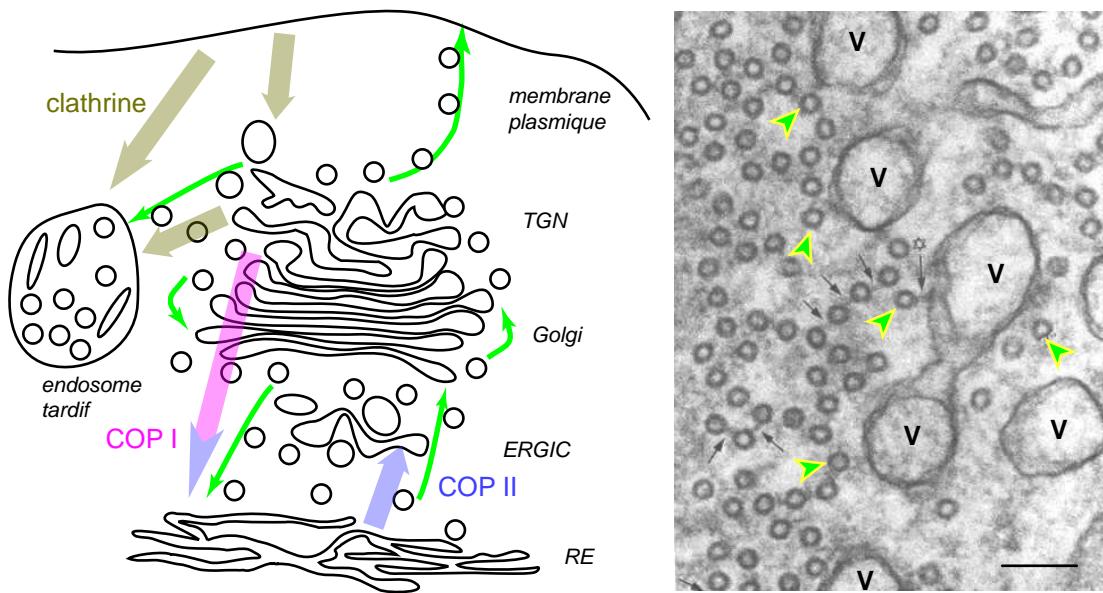
temporairement une cage autour de la vésicule (cette cage est très transitoire pour les vésicules à clathrine par exemple (Keyel and Traub 2004)). Elles sont généralement classées en fonction de la nature de ce manteau protéique, qui révèle leur compartiment d'origine et/ou détermine leurs compartiments-cibles. On distingue ainsi trois catégories essentielles de vésicules à manteau : les vésicules COPII (Matsuoka, Orci et al. 1998; Matsuoka, Schekman et al. 2001; Stagg, Gurkan et al. 2006) (impliquées dans le transport antérograde du RE vers l'ERGIC et le Golgi (Lee, Miller et al. 2004; Watson and Stephens 2005)), COPI (responsables du transport rétrograde du Golgi au RE, et des échanges entre saccules golgiennes (Lee, Miller et al. 2004; Malsam, Satoh et al. 2005)), et les vésicules couvertes de clathrines (impliquées dans l'endocytose et le transport à partir des endosomes et des vacuoles, mais aussi dans le trafic en partance du TGN (Crowther and Pearse 1981; Kirchhausen 2000; Sachse, Urbe et al. 2002; Motley, Bright et al. 2003; Keyel and Traub 2004; Rodriguez-Boulan and Musch 2005)) (Figure 9).

Sous ces trois grandes classes de vésicules, on regroupe en fait différents sous-types de chaque qui se distinguent selon les isoformes de sous-unités de manteau employées pour la formation de celui-ci, les adaptateurs, les petites GTPases (cf. 1.4.2), les facteurs d'arrimage (cf. 1.4.3), et les protéines SNAREs (cf. 1.4.4.) associés à la membrane de ces vésicules (Parlati, Varlamov et al. 2002; Mossessova, Bickford et al. 2003; Volchuk, Ravazzola et al. 2004).

1.2.1.3 Les étapes de la « vie » d'une vésicule en bref.

Les vésicules se forment à partir d'un compartiment donneur par bourgeonnement, puis fission. Elles sont ensuite transportées grâce au cytosquelette (microtubules ou fibres d'actine) avant d'atteindre un compartiment accepteur. Ce compartiment doit alors être compatible avec la vésicule pour que celle-ci puisse fusionner avec celui-là. En effet les compartiments ayant une composition lipidoprotéique déterminée, essentielle à ses fonctions, n'importe quelle vésicule ne doit pas être capable de la perturber. La fusion au sens large implique plusieurs étapes : « targetting », « tethering » ou « docking » suivant les auteurs, « docking » ou « priming » selon les auteurs, et « fusion ». Chacune de ces étapes est finement régulée et fait intervenir des complexes protéiques particuliers que je présente ci-après. La nomenclature pour les étapes de la fusion est confuse. Par la suite, j'ai fait le choix de parler d'adressage (« targetting »), arrimage (« tethering »), ancrage (« docking »), amorçage (« priming ») et fusion (« fusion »), cette dernière étape pouvant être elle-même décomposée en sous-événements : hémifusion (« hemifusion »), ouverture du pore de fusion, expansion, et fusion complète.

Figure 9. LES VESICULES DANS LE TRAFIC INTRACELLULAIRE



LEGENDE.

Les vésicules sont des compartiments d'échanges entre organites de plus grosse taille. Elles sont impliquées dans les échanges entre RE et Golgi, au sein du Golgi, entre TGN et membrane apicale et entre TGN et endosomes ou lysosomes. Pour cela elles doivent être transportées le long des microtubules (schématisés par des flèches vertes). Les vésicules sont de 3 classes selon les manteaux qui les recouvrent : COP I, COP II ou clathrine.

L'encart à droite montre des vésicules (V) associées à des microtubules (têtes de flèches vertes) en MET. Les petites flèches noires indiquent les complexes moteurs qui couplent soit microtubules et vésicules soit les microtubules entre-eux (barre 50 nm).

1.2.2 Rôle des petites GTPases, de la vésiculogenèse à l'adressage vésiculaire.

1.2.2.1 Fonctionnement des petites GTPases.

Les petites GTPases sont des protéines qui cyclent entre deux états : lié au GTP (actif) et lié au GDP (inactif). L'étape critique du cycle d'activation des petites GTPases est le relargage du GDP de la forme inactive pour permettre à nouveau la fixation de GTP. Cette étape est ainsi catalysée par des protéines appelées GEFs (« Guanine nucleotide Exchange Factors »), GEPs (« Guanine nucleotide Exchange Proteins ») ou encore GNRFs (« Guanine Nucleotide Releasing Factors ») (Takai, Kaibuchi et al. 1993; Erickson and Cerione 2004; Rossman, Der et al. 2005). Il existe également des inhibiteurs de cette étape appelés GDIs (« GDP Dissociation Inhibitors ») (Seabra and Wasmeier 2004; DerMardirossian and Bokoch 2005; Goody, Rak et al. 2005) (Figure 10B). Parmi les 7 familles et quelques 100 petites GTPases recensées (Figure 10A), deux familles sont impliquées dans la régulation du trafic vésiculaire (Takai, Sasaki et al. 2001). Il s'agit plus précisément des GTPases de type Sar1 / Arf qui régulent principalement la formation des vésicules (Balch 1990; Memon 2004; Munro 2005), et des Rab qui régulent transport, adressage et fusion des vésicules (Stenmark and Olikkonen 2001; Seabra, Mules et al. 2002; Jordens, Marsman et al. 2005) (Figure 10D).

1.2.2.2 Petites GTPases Sar1/Arf et régulation de la vésiculogenèse.

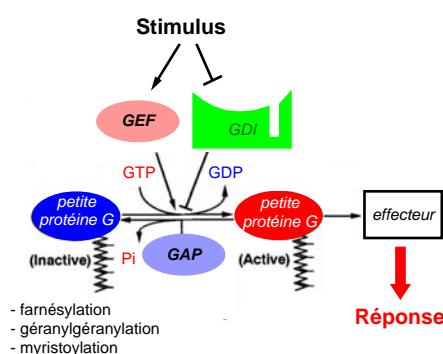
Un allèle défectif de *sar1* (« Sarcoma viruses protein 1 ») a été identifié chez la levure comme suppresseur du phénotype de *sec12* (*Sec12* est la GEF associée à Sar1 impliquée dans le transport à partir du RE) (Nakano, Brada et al. 1988; Nakano and Muramatsu 1989), deux isoformes ont été découvertes chez les vertébrés (Kuge, Dascher et al. 1994). Les protéines Arf (« ADP-ribosylation factor »), qui sont identiques à Sar1 à ~35%, sont au nombre de 3 chez la levure et 6 chez les vertébrés, et il existe aussi quelques ARLs (« ARF-Like proteins ») et ARDs (« ARF Domain proteins »). Arf1 est la mieux connue et a été localisée au niveau du Golgi (Stearns, Willingham et al. 1990). Depuis il est établi que les protéines Sar1/Arf sont impliquées dans le bourgeonnement des vésicules en formation (Schekman and Orci 1996; Moss and Vaughan 1998; Chavrier and Goud 1999), Arf1 a ainsi été montrée associée au Golgi, tandis que Arf6 est impliquée dans la vésiculogenèse à la membrane plasmique (Altschuler, Liu et al. 1999). Les protéines Sar1/Arf sont myristoylées en N-terminal sur une hélice amphipathique. L'ajout du groupement myristate permet l'ancre de la forme active (liée au GTP) à la bicoche lipidique membranaire, même si une

Figure 10. LES PETITES GTPASES.

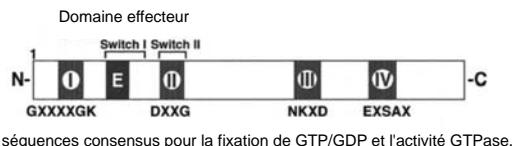
A Diversité.

familles	Ras	Rho	RAB	Sar1/Arf	RAN			
vertébrés	Ha-Ras	Rheb	RhoA	Rab1A	Rab11A	Rab26	Arf1	Ran
	Ki-Ras	κB -Ras1	RhoB	Rab1B	Rab11B	Rab27A	Arf2	
	N-Ras	κB -Ras2	RhoC	Tc10	Rab2	Rab12	Arf3	
	R-Ras		RhoD	Rab3A	Rab13	Rab28	Arf4	
	M-Ras		RhoE/	Rab3B	Rab14	Rab29	Arf5	
	RaiA		Rnd3/	Rab3C	Rab15	Rab30	Arf6	
	RaiB		Rho8	Rab3D	Rab16	Rab31	Sar1a	
	Rap1A		RhoG	Rab4	Rab17	Rab32	Sar1b	
	Rap1B		RhoH/	Rab5A	Rab18	Rab33A	Arl1	
	Rap2A		TTF	Rab5B	Rab19	Rab33B	Arl2	
	Rap2B		Rac1	Rab5C	Rab20		Arl3	
	Tc21		Rac2	Rab6	Rab21		Arl4	
	Rit		Rac3	Rab7	Rab22		Arl5	
	Rin		Cdc42	Rab8	Rab23		Arl6	
	Rad		Rnd1/	Rab9	Rab24		Arl7	
	Kir/Gem		Rho6	Rab10	Rab25		Ard1	
levure	Ras1		Rho1	Ypt1	Ypt52		Arf1	Gsp1
	Ras2		Rho2	Sec4	Ypt53		Arf2	Gsp2
	Rsr1		Rho3	Ypt31/	Ypt6		Arf3	
	Ycr7		Rho4	Ypt8	Ypt7		Sar1	
			Cdc42	Ypt32/	Ypt10		Arl1	
			Yns0	Ypt9	Ypt11		Arl2	
				Ypt51/			Cin4	
				Vps21				

B Régulation.



C Structure.

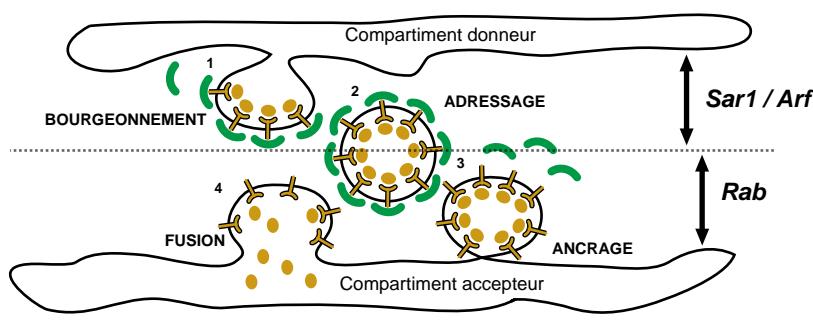


LEGENDE.

A : Tableau récapitulatif des différentes petites GTPases de vertébrés et de levure.

B : Modèle de régulation des petites GTPases. Les petites GTPases sont modifiées par des lipides qui permettent leur ancrage membranaire lorsqu'elles sont liées au GTP. L'échange du GDP pour du GTP est catalysé par une GEF ("guanine exchange factor") et inhibé (pour certaines GTPases seulement) par le GDI ("GTP dissociation inhibitor"). La GAP ("GTPase activating protein") active l'hydrolyse du GTP en GDP + Pi.

D GTPases et trafic vésiculaire.



C : Structure peptidique des petites GTPases, consensus pour les sites de fixation de GTP/GDP et domaines effecteurs.

D : Rôles séparés de deux familles de GTPases dans les échanges vésiculaires intercompartiment. Sar1/Arf est davantage impliquée dans la vésiculogenèse, et les Rabs sont impliquées dans l'adressage et l'association à la membrane cible.

interaction est aussi possible à l'état inactif (liée au GDP) (Franco, Chardin et al. 1995; Antonny, Beraud-Dufour et al. 1997) (Figure 11A). La GTPase active est ensuite capable de recruter des complexes adaptateurs de la clathrine comme AP-1 et AP-3 (Hirst and Robinson 1998), ou bien les complexes de manteaux COP (Wieland and Harter 1999), via des interactions directes avec certaines sous-unités (Zhao, Helms et al. 1997; Zhao, Helms et al. 1999). A ce niveau, certains phospholipides acides comme l'acide phosphatidique favorisent l'interaction avec le manteau, d'où l'influence des phospholipases sur la vésiculogenèse (Ktistakis, Brown et al. 1996). On pense actuellement que les protéines Sar1/Arf jouent un rôle dans la courbure initiale de la membrane en plus de leur rôle de recrutement sélectif des complexes adaptateurs et du manteau.

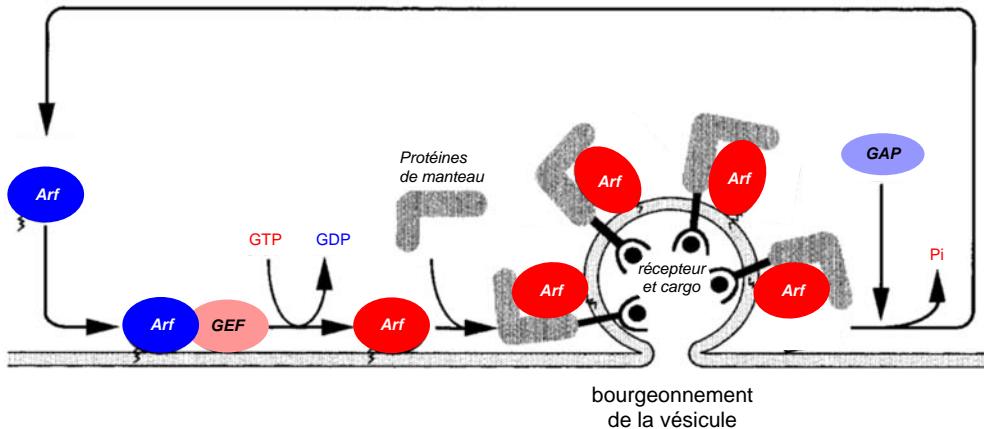
1.2.2.3 Rabs et régulation du trafic vésiculaire.

1.2.2.3.1 **Généralités.**

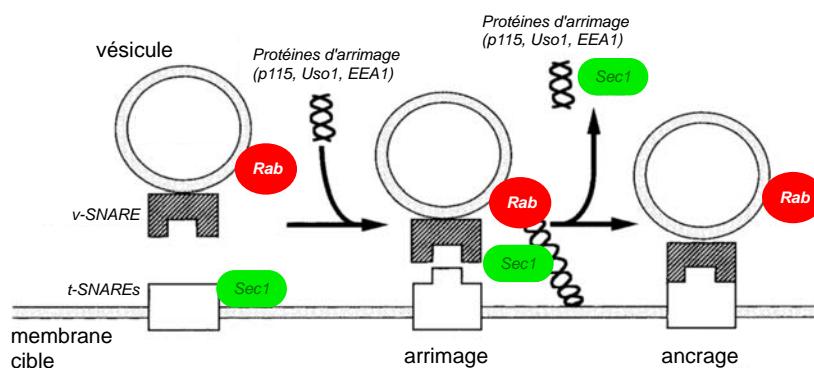
Les premières protéines Rab (« Ras genes from rat brain ») ont été découvertes dans cible pour des orthologues de Ypt1p (Gallwitz, Donath et al. 1983) sur une banque de cDNA de cerveau de rat (Touchot, Chardin et al. 1987). C'est actuellement la famille la plus nombreuse, avec plus de 50 membres connus actuellement chez les vertébrés (Martinez and Goud 1998), et 11 chez la levure (Lazar, Gotte et al. 1997). La première Rab impliquée dans le trafic vésiculaire entre Golgi et membrane plasmique est Sec4p (Salminen and Novick 1987). Le mutant *sec4* avait été identifié dans le cible pour des mutants de levure affectant la sécrétion (« *sec* »), un des travaux fondateurs de la biologie du trafic intracellulaire (Novick, Field et al. 1980). Il s'est ensuite avéré que Ypt1p est essentielle au trafic entre RE et Golgi (Segev, Mulholland et al. 1988). Depuis, le rôle des Rab dans le trafic vésiculaire a été largement confirmé (Olkkinen and Stenmark 1997; Martinez and Goud 1998; Somsel Rodman and Wandinger-Ness 2000; Pfeffer 2001; Stenmark and Olkkinen 2001; Seabra, Mules et al. 2002; Jordens, Marsman et al. 2005) (Figure 12A). Plus précisément la plupart des Rab sont impliquées soit dans le transport (sur le cytosquelette, Annexe 11), soit dans l'adressage, l'arrimage et la fusion des vésicules (Figures 11B et 12B). A l'instar des autres petites GTPases, les Rab sont associées à la membrane grâce à l'ajout d'acides gras. Pour les Rab, il s'agit de deux acides géranyliques ajoutés par la géranylgeranyltransférase II sur deux résidus cystéine spécifiques de la partie hypervariable de leur queue C-terminale. Cette modification est essentielle à l'ancrage membranaire, tandis que la partie hypervariable est spécifique d'un type de membrane (Chavrier, Gorvel et al. 1991; Brennwald and Novick 1993), bien qu'on ne sache pas comment. Comme les

Figure 11. MODELES D'ACTION DES GTPASES Arf ET Rab

A Rôle des Arfs dans le bourgeonnement des vésicules.



B Rôle des Rabs dans la fusion des vésicules.



LEGENDE.

A : Cycle d'activité des petites GTPases de la famille Sar1/Arf et rôle dans la vésiculogenèse. Sar1/Arf-GDP est recrutée à la membrane grâce à l'action de la GEF qui échange le GDP pour du GTP. L'insertion de son domaine hydrophobe et son interaction avec la membrane permet d'initier la courbure. Sar1/Arf-GTP est alors en mesure de recruter adaptateurs et protéines de manteau. Le bourgeonnement vésiculaire s'accentue sous la pression du manteau qui se forme, la fission de la vésicule requiert que Sar1/Arf-GTP activée par une GAP hydrolyse le GTP en GDP + Pi. Le manteau se détachera ensuite et Sar1/Arf-GDP se détachera de la membrane vésiculaire pour être recyclée.

B : Les Rabs vésiculaires (liées au GTP) permettent entre-autres le recrutement de facteurs d'arrimages. Ceux-ci rapprochent les membranes vésiculaire et cible, favorisant l'interaction des SNAREs vésiculaires (v-SNAREs) et de la membrane cible (t-SNAREs). La formation des complexes SNARE permet l'ancrage de la vésicule, étape préliminaire à l'amorçage et la fusion au sens strict.

autres GTPases, les Rabs sont liées au GDP dans leur conformation inactive, et sont cytosoliques pour 10 à 50%.

1.2.2.3.2 Rabs et vésiculogenèse.

A l'instar des protéines Sar1/Arf citées plus haut, certaines Rabs semblent impliquées précocement, dans le bourgeonnement vésiculaire. Ce serait le cas de Ypt31p et Ypt32p à la sortie du *trans*-Golgi (Benli, Doring et al. 1996), de Rab1 au niveau du RE (Nuoffer, Davidson et al. 1994), de Rab9 au niveau des endosomes tardifs (Riederer, Soldati et al. 1994), et de Rab5 associé à sa Rab GDI au niveau de la membrane plasmique (Horiuchi, Giner et al. 1995; McLauchlan, Newell et al. 1998). Enfin, la Rabphilin-11, effecteur de Rab11 important pour le recyclage des vésicules (Mammoto, Ohtsuka et al. 1999), interagit avec Sec13p (Mammoto, Sasaki et al. 2000) qui est impliquée avec Sar1 dans l'assemblage des vésicules COPII (Tang, Peter et al. 1997).

1.2.2.3.3 Rabs et transport vésiculaire.

Dans la grande famille des Rabs, beaucoup sont aussi associées à des moteurs moléculaires qui permettent le déplacement des vésicules et compartiments sécrétaires le long des cytosquelettes microtubulaire et d'actine (Annexe 11). Pour les mouvements le long des microtubules, on peu citer : Rab6 associée à la Rabkinésine-6 (Echard, Jollivet et al. 1998; Echard, el Marjou et al. 2001; Fuchs, Short et al. 2005; Young, Stauber et al. 2005), Rab5 (Nielsen, Severin et al. 1999), Rab4 ou Rab7 et les moteurs dynéine et dyname (Bielli, Thornqvist et al. 2001; Jordens, Fernandez-Borja et al. 2001; Lebrand, Corti et al. 2002; Johansson, Lehto et al. 2005), Rab11 et la Rabphiline-11 (Dollar, Struckhoff et al. 2002), Rab8 et Rab8ip (« Rab8 interacting protein ») (Huber, Pimplikar et al. 1993; Peranen, Auvinen et al. 1996; Chabriat, Wilhelm et al. 2005). Pour l'association avec l'actine, les moteurs impliqués sont par exemple les myosines Va et VIIa qui interagissent avec Rab27A (Langford 2002; Gibbs, Azarian et al. 2004). On peut également citer le cas de Sec4p qui s'associe avec Sec2p (sa GEF) dans le cadre du transport des vésicules en partance du Golgi, sur le réseau d'actine (Walch-Solimena, Collins et al. 1997), et la Rabphiline-3 qui s'associe à l'α-actinine (Kato, Sasaki et al. 1996).

1.2.2.3.4 Des Rabs préparent la fusion entre vésicules et compartiment cible.

Deux systèmes ont été utilisés pour étudier la fonction des Rab dans la fusion : le modèle murin (système neuroendocrinien) pour Rab3A (Geppert, Bolshakov et al. 1994; Castillo, Janz et al. 1997; Geppert, Goda et al. 1997) et la levure pour Sec4p, Ypt1p, Ypt7p (Salminen and Novick 1987; Cao, Ballew et al. 1998; Ungermann, Nichols et al. 1998; Ungermann, Sato et al. 1998).

Il a été ainsi montré chez la levure, que Ypt1p au niveau du Golgi et Ypt7p à la membrane de la vacuole, sont requises pour l'arrimage (« tethering ») de la vésicule à la membrane réceptrice, indépendamment et en amont (avant l'ancrage, ou « docking ») des SNAREs (Cao, Ballew et al. 1998; Ungermann, Nichols et al. 1998; Ungermann, Sato et al. 1998). Cependant, des surexpressions de certaines SNAREs ou l'expression de SNAREs mutées peuvent sauver des mutants de *sec4* et *ypt1*, indiquant que les Rab collaborent probablement avec les SNAREs, mais ne sont pas essentielles à la fusion (Dascher, Ossig et al. 1991; Brennwald, Kearns et al. 1994). Des complexes dis « d'arrimage » comme p115/Uso1p (« ysou 1 », *yusou* signifiant transport en japonais) (Nakajima, Hirata et al. 1991) pour Ypt1p (Cao, Ballew et al. 1998), interviennent en fait avant l'action des SNAREs et sont recrutés par les Rabs pour favoriser l'ancrage de la vésicule promu par l'association entre v- et t-SNAREs.

Parmi ceux-là on compte également la Rabadaptine-5 qui intervient dans la fusion des vésicules d'endocytose au niveau des endosomes précoces. Elle interagit avec Rab-5 (Stenmark, Vitale et al. 1995; Vitale, Alexandrov et al. 1995) et Rab-4 (Vitale, Rybin et al. 1998), la protéine EEA1 (« Early Endosome Autoantigen 1 ») et la Rabphiline-3. Cette dernière interaction est régulée négativement par Rab3A (cf. paragraphe suivant) et révèle probablement un couplage entre endocytose et exocytose au niveau synaptique (Ohya, Sasaki et al. 1998). La protéine EEA1 quant-à elle, possède en C-ter un site « FYVE » de fixation au PIP₃ (« Phosphatidylnositol-3,4,5-triPhosphate »), lipide spécifiquement enrichi au niveau des endosomes précoces (Simonsen, Lippe et al. 1998).

Un autre type de complexe d'arrimage et d'ancrage spécifique de la membrane plasmique est associé à la Rab Sec4p. Il s'agit de l'exocyste composé des sous-unités Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p et Exo70p (Guo, Roth et al. 1999), dont je reparlerai plus loin (cf. partie II Résultats). Celui-ci interagit également avec Rab11 (Zhang, Ellis et al. 2004).

1.2.2.3.5 Rôle des Rab dans la fusion membranaire.

Contrairement à ce qui vient d'être vu, les données obtenues chez la souris semblent indiquer que Rab3A n'est pas du tout requise avant les SNAREs, mais le serait en aval, pour une étape de fusion dépendante du calcium (Castillo, Janz et al. 1997; Geppert, Goda et al. 1997). Cette différence s'ajoute au fait que dans le cas de Rab3A dans le système neuroendocrinien murin, l'hydrolyse du GTP en GDP stimulée par la GAP est essentielle à cette fonction tardive dans la fusion (Lledo, Vernier et al. 1993; Holz, Brondyk et al. 1994; Johannes, Lledo et al. 1994; Lledo, Johannes et al. 1994), contrairement au cas de Ypt1p dont le rôle précoce dans la l'exocytose ne requiert pas l'hydrolyse du GTP (Richardson, Jones et al. 1998). Une interprétation serait que Rab3A liée au GTP inhiberait la fusion en

interagissant avec un complexe de pré-fusion (Lledo, Johannes et al. 1994). Les effecteurs de Rab3 comme la Rabphiline-3 (Li, Takei et al. 1994; Deak, Shin et al. 2006) et Rim (Wang, Okamoto et al. 1997; Wang, Sugita et al. 2000; Dulubova, Lou et al. 2005; Weimer, Gracheva et al. 2006) contiennent un domaine N-ter de liaison à la Rab à laquelle ils s'associent et un ou deux domaines C2 de liaison au calcium en C-ter (Oishi, Sasaki et al. 1996). De plus, l'expression des domaines C-ter ou N-ter de la Rabphiline-3 bloquent l'exocytose régulée par le calcium, ce qui corrobore l'idée d'une spécificité de Rab3 via la Rabphiline-3 dans ce processus. De façon intéressante, la rabphiline interagit aussi avec la SNARE SNAP-25 pour l'activer, indépendamment de Rab3 (Staunton, Ganetzky et al. 2001; Deak, Shin et al. 2006; Deak, Shin et al. 2006). Si Rab3 semble impliquée dans le recrutement de la rabphiline, elle n'est donc pas essentielle à sa fonction, ce qui rejoint les données d'interactions génétiques entre Rabs et SNAREs chez la levure (cf. plus haut). D'autre part, le fait que les mutants *rabphiline-3* ne présentent pas les phénotypes des mutants *rab3* (Schluter, Schnell et al. 1999), indique qu'on est face à un système à au moins deux effecteurs, dont Rim est le second. Les fonctions exactes de Rim (Calakos, Schoch et al. 2004; Dulubova, Lou et al. 2005; Kaeser and Sudhof 2005) et de la Rabphiline-3 (Baldini, Martelli et al. 2005; Deak, Shin et al. 2006) et les étapes de la fusion dans lesquelles elles interviennent sont cependant encore mal définies.

La vision actuelle favorise donc l'idée que les protéines Rabs liées au GTP et leurs effecteurs servent à l'arrimage de la vésicule à sa membrane cible, régulent la dissociation de Sec1/Munc18, favorisant l'association des v- et t-SNAREs, et facilitent ainsi l'ancrage par les SNAREs, nécessaire pour initier la fusion proprement dite. Certaines Rabs comme Rab3A joueraient en plus un rôle plus tardif, dépendant de l'hydrolyse du GTP.

1.2.3 Les facteurs d'arrimage vésiculaires.

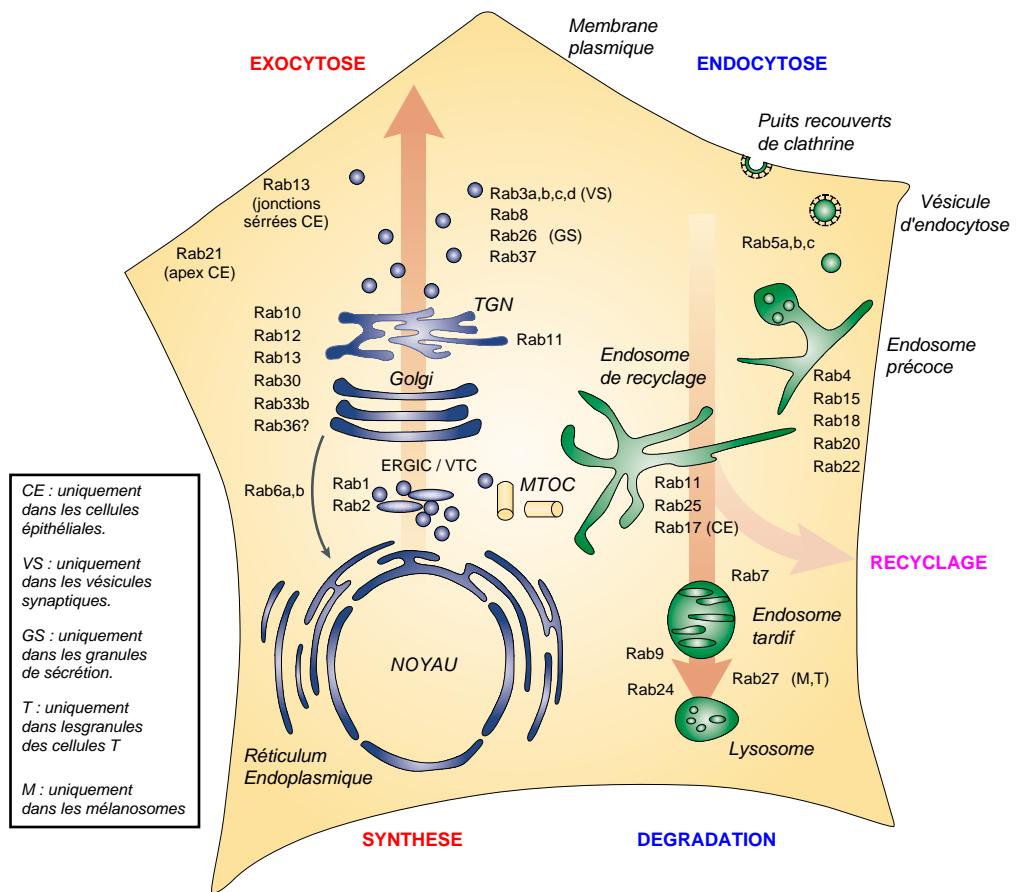
1.2.3.1 Diversité des facteurs d'arrimage.

1.2.3.1.1 *Les apports initiaux de l'étude de p115/Uso1p.*

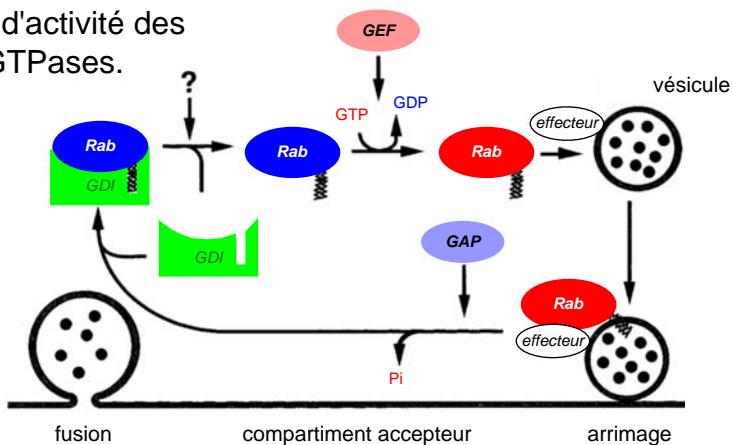
Comme évoqué dans le paragraphe précédent, les facteurs d'arrimage FAs (« tethering factors », Figure 13), sont des protéines dont le rôle dans la fusion vésiculaire est requis en amont des SNAREs, pour faciliter leur activité, et qui sont recrutés par les petites GTPases (Figure 13B). Leur existence a été suspectée lorsqu'on s'est aperçu que l'inactivation des complexes SNAREs par des toxines (Humeau, Doussau et al. 2000) ne prévenait pas

Figure 12. RAB GTPASES ET TRAFIC VESICULAIRE.

A Diversité et Localisation des Rab-GTPases.



B Cycle d'activité des Rab-GTPases.



LEGENDE.

A : Les différentes Rabs ont une préférence pour des domaines membranaires de compositions lipidiques différentes, ce qui provoque leur enrichissement dans des organites différents. Cette distribution est en partie responsable du trafic vésiculaire différentiel.

B : Les Rabs activées par leur GEF interviennent principalement en contrôlant l'association de la vésicule avec son compartiment cible par le recrutement d'effecteurs qui permettront son arrimage et sa fusion subséquente.

l'arrimage des vésicules neurosécrétaires à la membrane présynaptique (Hunt, Bommert et al. 1994). Les mieux connus sont les FAs golgiens, parmi lesquels le trio p115 (Uso1p chez la levure), GM130 et Giantine est à l'origine des modèles d'arrimage vésiculaire. Ces facteurs sont des protéines à domaines « coiled-coil » (CC) qui fonctionnent en homodimère. p115 est un homodimère pourvu de 2 têtes globulaires et d'une queue de 55 nm à 4 domaines CC qui rappelle la structure de la myosine II (Sapperstein, Walter et al. 1995). On trouve p115 chez tous les eucaryotes, au niveau du RE, de l'ERGIC, et du Golgi (Nelson, Alvarez et al. 1998). Son importance dans la fusion des vésicules COPII a été d'abord été montrée chez la levure (Barlowe 1997) puis chez les vertébrés (Allan, Moyer et al. 2000). Il a ensuite été montré que p115 interagit avec GM130 (Nakamura, Lowe et al. 1997) et la Giantine (Lesa, Seemann et al. 2000; Linstedt, Jesch et al. 2000). GM130 est trouvée chez tous les animaux mais pas chez la levure où la queue allongée d'Uso1p jouerait le rôle de GM130. La giantine quant-à elle n'existe que chez les mammifères. GM130 et la Giantine ont également été impliquées dans l'arrimage vésiculaire des vésicules COPII (Moyer, Allan et al. 2001) et COPI (Sonnichsen, Lowe et al. 1998) respectivement.

Il a ainsi été proposé que les facteurs d'arrimage pouvait rendre compte de l'observation en ME de ponts moléculaires de 50 à 300 nm entre les vésicules et la membrane (Orci, Perrelet et al. 1998). La présence de p115 sur les vésicules COPII et de GM130 à la membrane du cis-Golgi, a inspiré un premier modèle d'arrimage vésiculaire, impliquant la formation d'un pont par interaction entre p115 et GM130. Un modèle impliquant le trio p115/GM130/Giantine a également été proposé (Sonnichsen, Lowe et al. 1998). Ces modèles sont cependant peu crédibles étant donné que GM130 et la Giantine se sont révélées facultatives dans différentes études (Puthenveedu and Linstedt 2001; Kondylis and Rabouille 2003), et qu'il n'y a pas de GM130 chez la levure, ni de Giantine en dehors des mammifères.

1.2.3.1.2 D'autres FAs à domaine « coiled-coil » (CC).

A la suite des études sur p115, GM130 et la Giantine, d'autres complexes d'arrimage mettant en jeu de longues protéines à domaines CC ont été mis en évidence. On peut citer ici CASP/COY1 (« CDP - « CAAAT-Displacement Protein » - Alternatively Spliced Product ») (Lievens, Tufarelli et al. 1997) qui est une protéine transmembranaire de type II à longue queue cytoplasmique à domaine CC (comme les FAs Giantine et Golgine 84) trouvée au niveau du Golgi et qui interagit génétiquement avec les SNAREs Golgiennes Sec22p et Gos1p chez la levure (Gillingham, Pfeifer et al. 2002). Il y a également la Golgine 60 (GCP60) qui interagit avec la Giantine (Sohda, Misumi et al. 2001), GMAP210, RUD3, les golgines 45, 84, 97, 245, GRASP55, GRASP65 et d'autres protéines dont le rôle dans l'arrimage n'est pas encore établi (Sztul and Lupashin 2006) (Figure 13A).

1.2.3.1.3 Des FAs multimériques.

Tous les FAs ne possèdent pas de structure allongée dotée de domaines CC, et fonctionnent comme une association de multiples sous-unités de taille plus modeste. C'est le cas du complexe COG (« Conserved Oligomeric Golgi ») (Figure 13A) (Shestakova, Zolov et al. 2006; Ungar, Oka et al. 2006) qui interagit génétiquement chez la levure avec Ypt1, les SNAREs intragolgiennes et le manteau COPI., et serait impliqué dans l'arrimage des vésicules COPI au *cis*-Golgi pour le transport rétrograde (Suvorova, Duden et al. 2002; Zolov and Lupashin 2005). D'autres complexes sont également impliqués dans différents compartiments comme Dsl1 pour le transport rétrograde Golgi-RE (Reilly, Kraynack et al. 2001), les complexes TRAPP I (« TRAnsport Protein Particle ») pour l'arrimage entre COPII et Golgi (Sacher, Jiang et al. 1998; Barrowman, Sacher et al. 2000; Loh, Peter et al. 2005), TRAPP II pour le trafic intragolgien (Lowe 2000; Sacher, Barrowman et al. 2001), le complexe GARP (« Golgi-Associated Retrograde Protein ») pour le transport rétrograde endosomes – TGN (Oka and Krieger 2005), et enfin l'exocyste (Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70p et Exo84p) qui intervient dans l'exocytose et le recyclage à la membrane plasmique (plus particulièrement basolatérale dans les cellules polarisées) (Hsu, TerBush et al. 2004; Clandinin 2005; Somers and Chia 2005).

1.2.3.2 Recrutement des FAs.

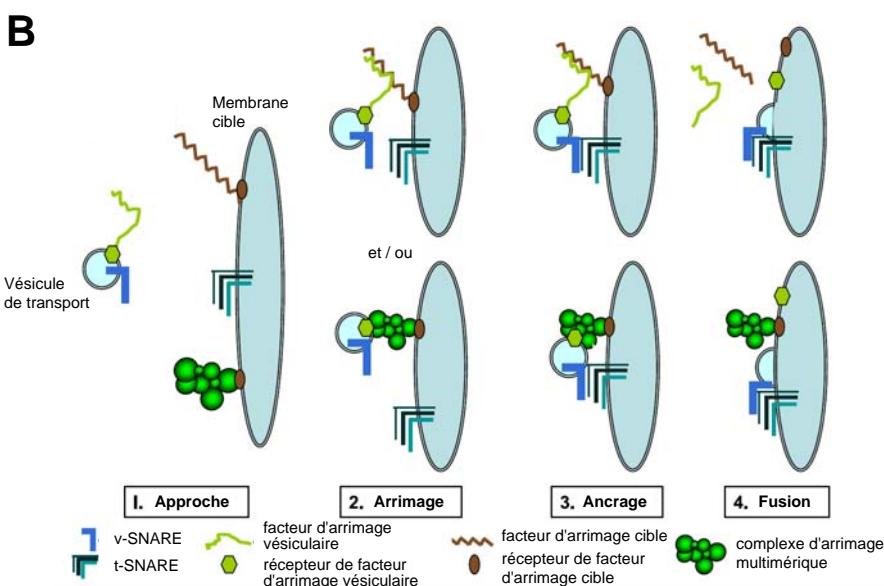
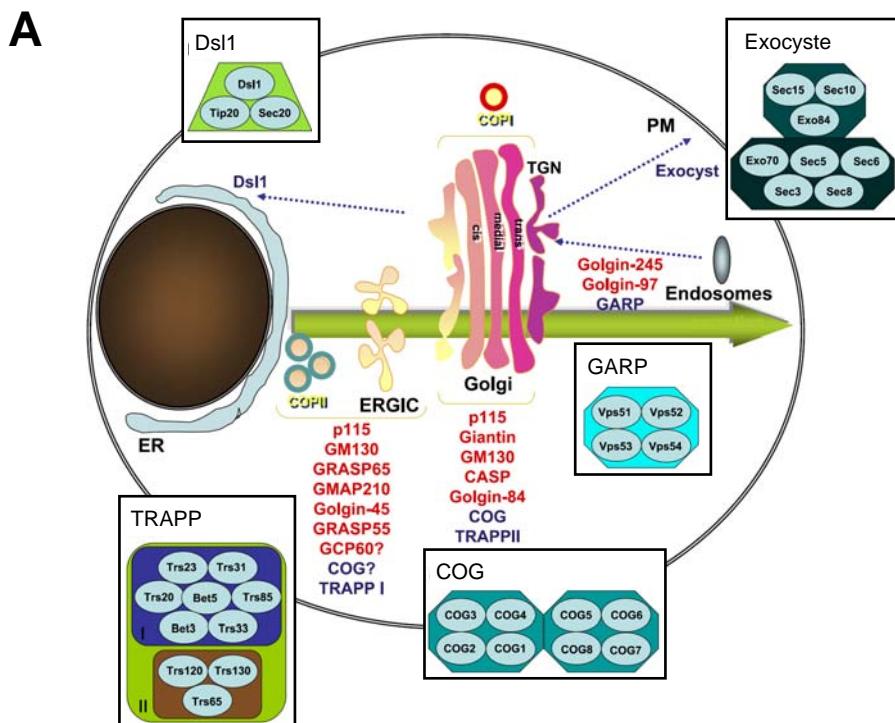
Le recrutement repose dans une large mesure sur le rôle de petites GTPases comme les Rabs, Arfs, Arls et Rals qui présentent déjà une spécificité de localisation comme on l'a vu précédemment. Cependant ce type de recrutement semble davantage caractéristique des FAs à domaines CC comme p115, les golgines et GMAP210, via leurs domaines CRIB (pour les golgines et GCC) ou CRAB (pour RUD3 et GMAP210). Le complexe TRAPP quant-à lui, interagirait directement avec des domaines membranaires particuliers grâce notamment à une palmitoylation (Kim, Sohn et al. 2005; Turnbull, Kummel et al. 2005).

1.2.3.3 Les FAs ont de multiples fonctions dans le trafic vésiculaire.

1.2.3.3.1 *L'appariement de deux membranes.*

L'idée d'un pont impliquant des FAs de la membrane vésiculaire d'une part et acceptrice d'autre part pour les longs FAs à domaines CC est toujours la conception actuelle. Cette idée est aussi compatible pour les complexes multimériques comme TRAPP. Dans le cas de l'exocyste, certaines sous-unités du complexe seraient associées à la membrane vésiculaire et les autres à la membrane plasmique. La fusion ne serait alors

Figure 13. LES FACTEURS D'ARRIMAGE.



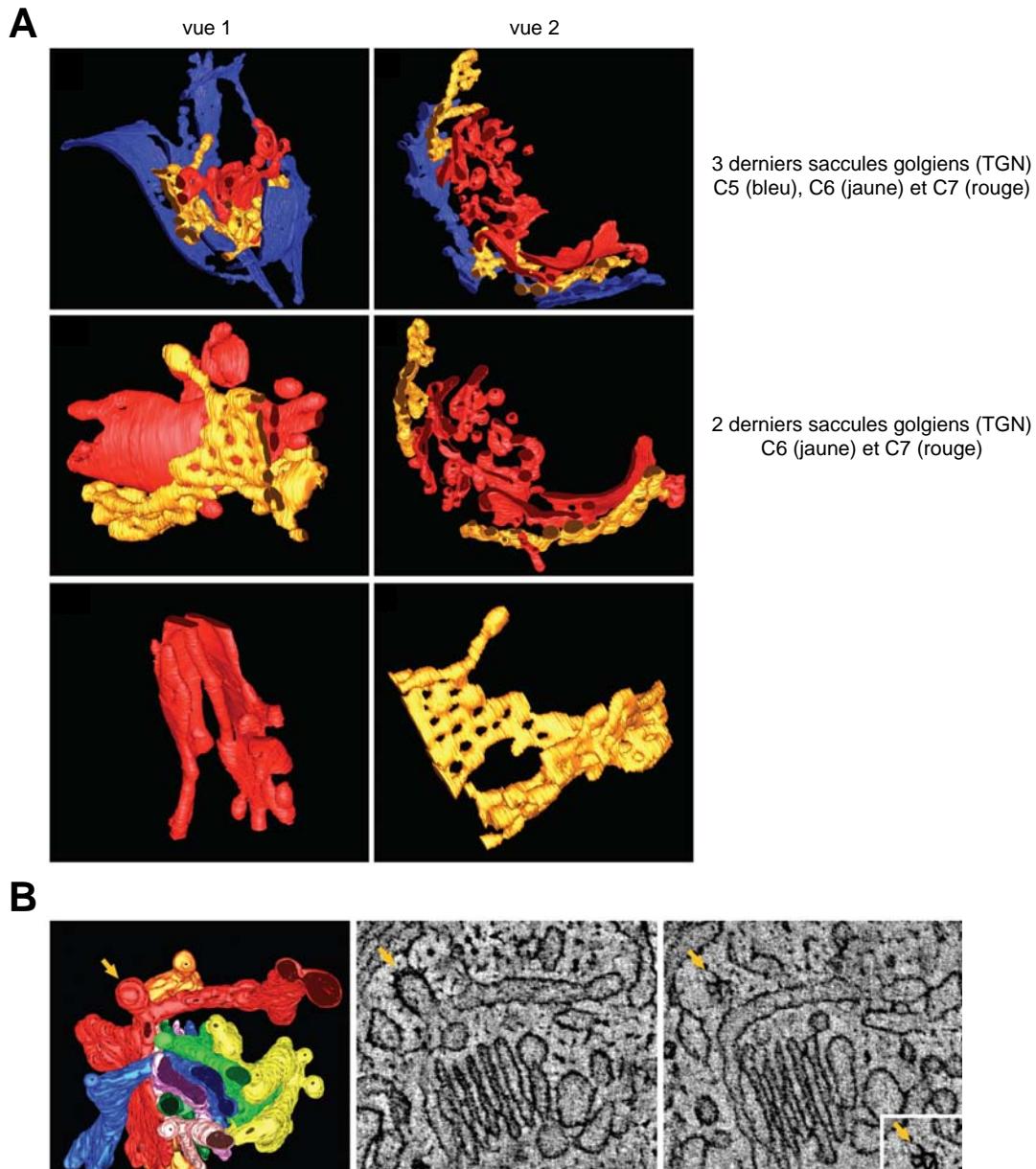
LEGENDE.

A : Les différents facteurs d'arrimage (FAs) et leurs compartiments associés. Les FAs de type "coiled-coil" (CC) et de type multimériques sont indiqués au niveau des organites où ils jouent leur rôle, ils sont particulièrement abondants et divers au niveau du RE et du Golgi. La composition des facteurs d'arrimage multimériques est détaillée dans les encarts.

B : Modèles de fonctionnement des FAs de type CC et multimérique. Les FAs interviennent en amont des complexes SNAREs pour faciliter le rapprochement de la vésicule et de sa membrane cible, permettant la formation des complexes SNAREs pour l'ancrage vésiculaire et la fusion subséquente.

Contrairement à ce qui est indiqué sur ce schéma, le complexe exocyste n'est probablement pas complet au niveau de la membrane cible, et ce sont les sous-unités manquantes associées à la vésicules qui permettraient de reconstituer le complexe actif autorisant la fusion.

Figure 8. trans-GOLGI (TGN)



LEGENDE.

A : La reconstruction 3D du Golgi permet d'isoler les volumes des différentes citernes golgiennes. les Citernes C5, C6 et C7 d'une cellule NRK sont visualisés en fausses couleurs. La dernière citerne (en rouge en bas à gauche) présente une structure tubulo-vésiculaire.

B : Reconstruction 3D d'un appareil de Golgi complet de cellule NRK où tous les saccules ont été colorés différemment. Les bourgeons vésiculaires couverts de clathrine (flèche orange) sont uniquement observés au niveau de la dernière citerne (rouge). Les photos en microscopie électronique à transmission de deux images correspondant au milieu de ce bourgeon (image centrale) et à son extrémité (image de droite, barre 100 nm).

possible qu'une fois le complexe fonctionnel reconstitué par l'arrimage de la vésicule à la membrane. On ne peut pas exclure que les SNAREs qui présentent également une spécificité de localisation intracellulaire participent au recrutement des FAs (Szul and Lupashin 2006).

1.2.3.3.2 Un rôle de Rab-GEF pour TRAPP ?

S'il est généralement admis que les FAs jouent un rôle dans l'arrimage, donc en aval des Rabs et en amont de SNAREs, il a également été montré pour le complexe TRAPP qu'il pouvait jouer un rôle de GEF à la fois pour Ypt1p et Ypt31p/Ypt32p (Jones, Newman et al. 2000; Sacher, Barrowman et al. 2001). Ce qui signifierait que TRAPP orchestrerait les échanges antérograde et rétrograde entre RE et Golgi, en modulant l'activité des Rabs qui régulent ces échanges.

1.2.3.3.3 Certains FAs réguleraient la dynamique des manteaux COP.

Les FAs COG et TRAPP I interagissent directement avec les manteaux COPI (Suvorova, Duden et al. 2002) et COPII (Sacher, Barrowman et al. 2001) respectivement. De plus, p115/Uso1p interagit avec l'Arf-GEF GBF1 (« Golgi-specific Brefeldin A-resistant Factor 1 ») activatrice d'Arf qui régule la dynamique du manteau COPI lors de la vésiculogenèse (Garcia-Mata, Szul et al. 2003). Ces données suggèrent que des FAs jouent probablement un rôle au moins indirect dans la dynamique des protéines de manteau.

1.2.3.3.4 Une association préférentielle avec certains cargos : un rôle de tri des FAs ?

Le tri des protéines ancrées au GPI est réalisé dès le RE. De façon intéressante, ce tri requiert p115/Uso1p, mais aussi le complexe multimérique COG (Morsomme and Riezman 2002). Au niveau des sites de sortie du RE également, la Golgine-45 est requise pour le transport antérograde de VSV-G (« Vesicular Stomatitis Virus-G protein ») et des protéines résidentes du Golgi (Short, Preisinger et al. 2001). D'autres FAs interagissent spécifiquement avec certains cargos comme GM130 et HERG (« Human Ether-à-gogo-Related Gene ») (Roti, Myers et al. 2002), p115/Uso1p et IRAP (« Insulin-Related AminoPeptidase ») (Hosaka, Brooks et al. 2005) ou GRASP55 et TGF- α (« Transforming Growth Factor α ») (Kuo, Zhong et al. 2000). Ces résultats indiquent que les FAs pourraient présenter une spécificité de cargo et intervenir dans le tri protéique.

1.2.3.3.5 Rôle dans l'assemblage des complexes SNAREs.

p115/Uso1p est requis *in vivo* pour la formation de complexes SNAREs chez la levure Sapperstein, 1996 #508}. De plus, *in vitro*, le premier domaine CC de p115/Uso1p, qui est très similaire à celui des SNAREs, stimule la formation des complexes SNAREs comprenant

GOS28 et la syntaxine 5 (Shorter, Beard et al. 2002). Un autre complexe de FA, GARP, fixe la queue N-terminale de la t-SNARE (« target-SNARE ») Tlg1p, rendant accessible son motif SNARE (Siniossoglou and Pelham 2001). SEDL (« SpondyloEpiphyseal DispLasia ») une sous-unité de TRAPP présente également une structure similaire à celles des domaines régulateurs N-terminaux des SNAREs Ykt6p et Sec22b (Jang, Kim et al. 2002). Enfin, p115/Uso1p interagit génétiquement (Grabowski and Gallwitz 1997) et physiquement (Shorter, Beard et al. 2002) avec le complexe Sec1/Munc18 régulant l'assemblage des complexes SNAREs. Il est donc possible que les FAs activent les complexes SNAREs en rendant accessible leurs domaines effecteurs par interaction directe ou indirecte.

1.2.3.3.6 Autres rôles des FAs.

La Golgine-245 et p115/Uso1p auraient un rôle lié au cytosquelette, ainsi que d'autres FAs potentiels comme Hook3, CLIPR-59, Bicaudal-D1, ou encore la Golgine « lava lamp ». Enfin certaines Golgines comme GM130 pourraient recruter des protéines régulatrices, ou servir de cible pour orchestrer des changements morphogénétiques du Golgi (Sztul and Lupashin 2006).

1.2.4 Une spécificité de fusion grâce aux protéines SNAREs ?

1.2.4.1 Mise en évidence des SNAREs dans la fusion.

Les premières SNAREs (« Soluble NSF Attachement protein REceptors ») identifiées furent celles de la famille des VAMP (« Vesicle Associated Membrane Proteins »)/synaptobrénives découvertes dans les vésicules synaptiques. (Trimble, Cowan et al. 1988; Baumert, Maycox et al. 1989), SNAP-25 (« Synaptosome-Associated Protein of 25kD ») (Oyler, Higgins et al. 1989), et la syntaxine 1 trouvée associée à la membrane plasmique des terminaisons synaptiques des neurones de mammifères avec les canaux calciques (Bennett, Calakos et al. 1992). Les premières SNAREs de levure avaient été trouvées indépendamment dans le crible pour des mutants de sécrétion qui a fondé la biologie du trafic intracellulaire (Novick, Field et al. 1980). Depuis 25 SNAREs ont été trouvées chez la levure, 36 chez l'homme et 54 chez Arabidopsis, associées aux divers compartiments cellulaires (Duman and Forte 2003; Weimbs, Low et al. 2003; Hong 2005; Jahn and Scheller 2006). Dès 1993 cependant l'hypothèse des SNAREs (« SNARE Hypothesis ») était formulée, stipulant qu'à une SNARE de type vésiculaire (v-SNARE pour « vesicular-SNARE ») correspondait une SNARE cible (t-SNARE pour « target-SNARE ») et

que l'association des deux permettait la fusion d'une vésicule donnée avec son compartiment cible (Sollner, Bennett et al. 1993; Sollner, Whiteheart et al. 1993), impliquant l'existence d'un code SNARE. Du fait de l'existence de fusions homotypiques entre vésicules, les appellations v-SNAREs et t-SNAREs ont par la suite été remplacées par celles de Q-SNAREs (Q pour glutamine, correspondant aux VAMPs et SNAPs) et R-SNAREs (R pour arginine, correspondant aux syntaxines) en raisons de la présence d'un résidu extrêmement conservé qui permettait de les discriminer (Fasshauer, Sutton et al. 1998). Cette étude a également proposé le modèle d'association impliquant 3 hélices à domaine Q-SNARE (1 de VAMP et deux de SNAP) et 1 hélice à domaine R-SNARE (venant de la syntaxine cible) (Figure 14A et 28B). Le nom de SNARE vient de leur capacité à lier les α -, β -, et γ -SNAP (« Soluble NSF Attachment Protein ») qui elle-même fixe le facteur de fusion membranaire NSF (« N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion protein » ou « N-ethylmaleimide-Sensitive Factor ») (Glick and Rothman 1987; Block, Glick et al. 1988) impliqué dans la fusion vésiculaire (Malhotra, Orci et al. 1988). C'est l'effet inhibiteur de la fusion vésiculaire des neurotoxines botuliques et de la toxine tétanique (clivant spécifiquement les SNAREs) qui a mis en évidence le rôle des SNAREs dans la fusion (Montecucco and Schiavo 1995).

1.2.4.2 Les protéines SNAREs forment-elles des complexes « spécifiques » ?

1.2.4.2.1 Formation des complexes SNAREs.

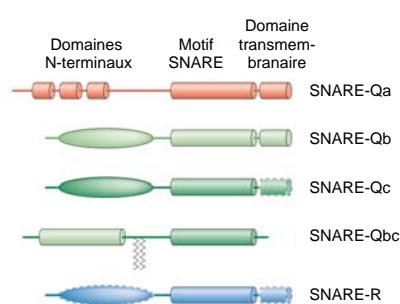
La famille des SNAREs est caractérisée par la présence d'un domaine SNARE de 60-70 acides aminés formant des heptades répétées adoptant une structure en hélice. D'autre part la plupart des SNAREs présentent soit un domaine C-terminal transmembranaire, soit des résidus palmitoylés (cas de SNAP-25) ou encore une « boîte » CAAX permettant leur farnésylation et leur ancrage membranaire (cas de Ykt6p). (McNew, Sogaard et al. 1997). Certaines SNAREs à domaine transmembranaire sont aussi palmitoylées pour prévenir leur ubiquitination et leur dégradation (Valdez-Taubas and Pelham 2005). Lorsque les SNAREs sont sous forme monomérique, elles ne sont pas structurées. C'est la rencontre de partenaires définis qui permet l'association de leurs motifs en structures hélicoïdales très stables (Fasshauer, Antonin et al. 2002; Fasshauer 2003) formées de quatre hélices α fournies par les motifs SNARE de chaque partenaire du complexe. Chaque complexe implique 4 types d'hélices : Qa, Qb, Qc et R, qui définissent des familles de SNAREs très conservées (Bock, Matern et al. 2001; Hong 2005). Un complexe fonctionnel est donc de type QabcR.

1.2.4.2.2 Spécificité d'association des SNAREs.

Figure 14. STRUCTURE ET FONCTION DES COMPLEXES SNARES DANS LA FUSION VESICULAIRE.

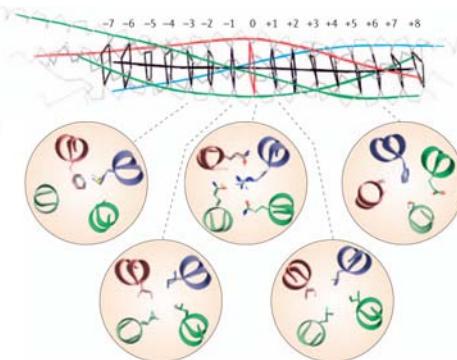
A

Structures des SNAREs



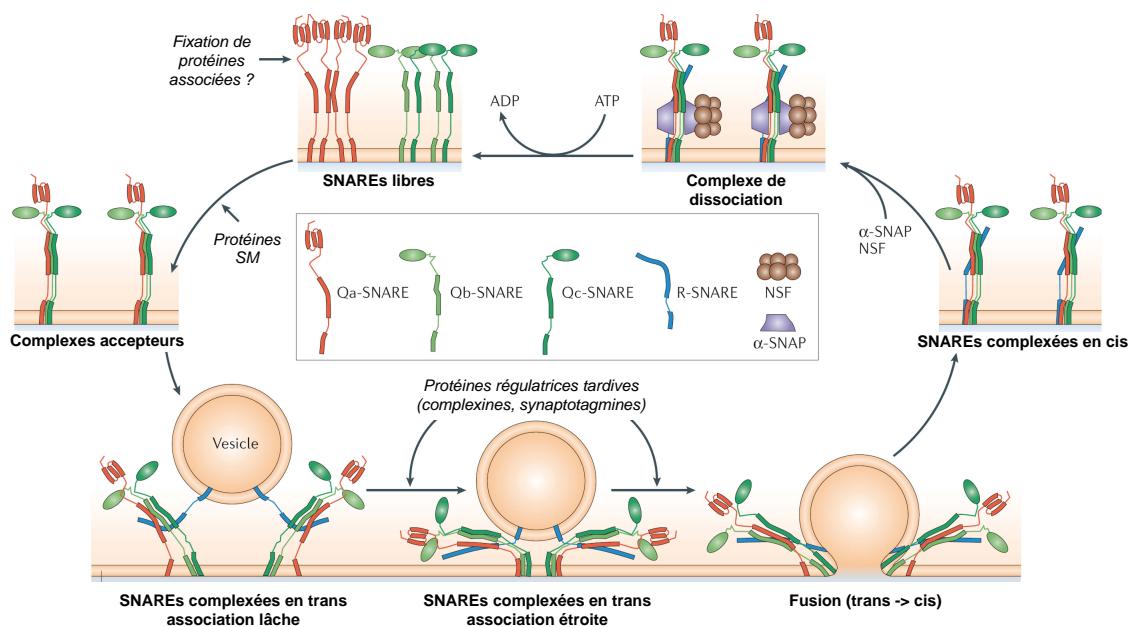
B

Association des motifs SNAREs



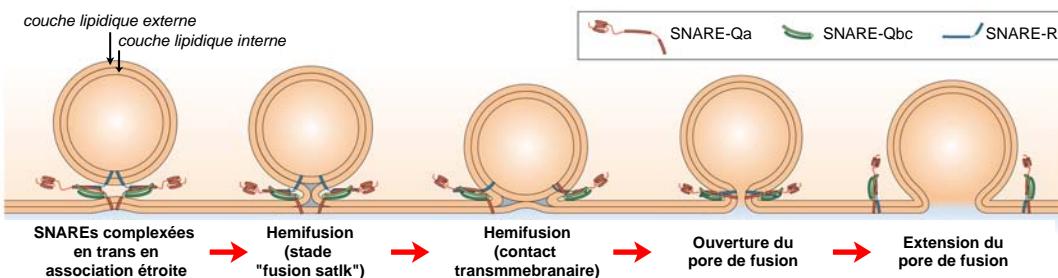
C

Cycle de fonctionnement des SNAREs



D

Modèle de fusion par les SNAREs.



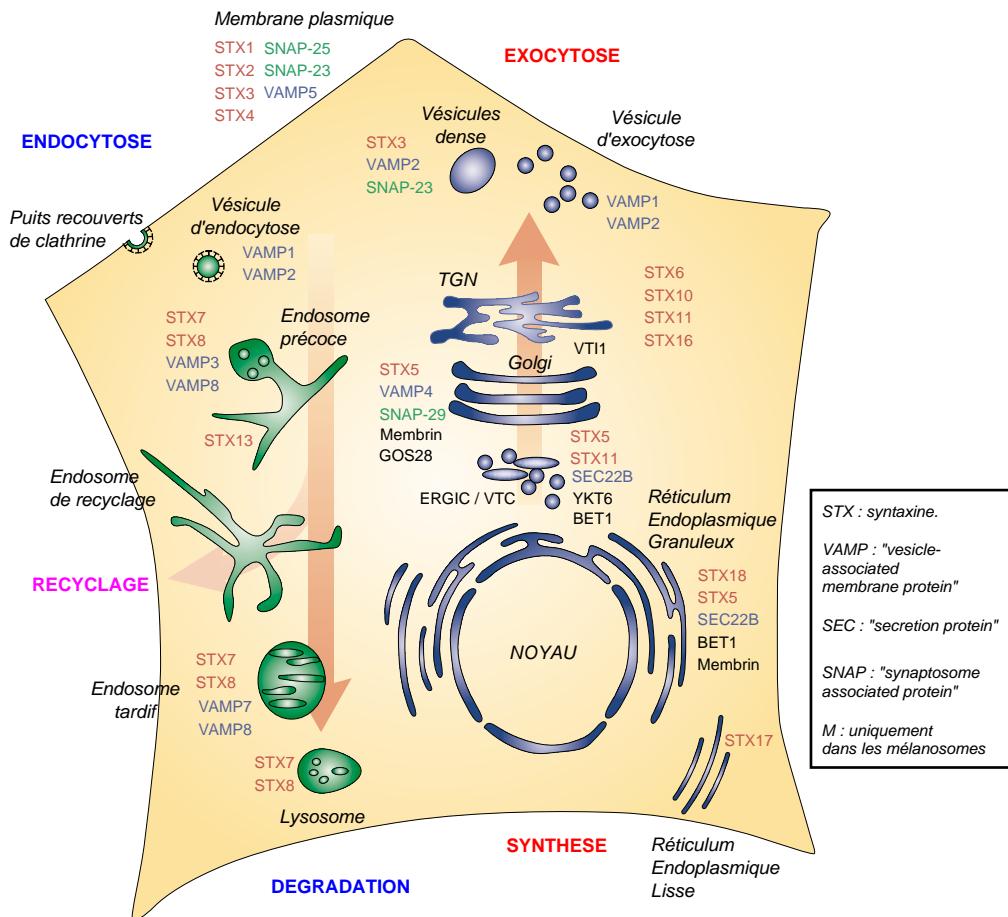
L'hypothèse SNAREs formulée en 1993 stipulait, avant que les résultats expérimentaux ne le montrent, qu'il existe une spécificité d'association des SNAREs, et donc une spécificité de fusion médiée par les SNAREs. Par la suite, plusieurs travaux ont montré que cette spécificité existait et cela constitua un paradigme (Calakos, Bennett et al. 1994; Pevsner, Hsu et al. 1994; Bennett 1995; Linial 1997). Ce fût confirmé par des expériences de fusion de liposomes avec des SNAREs de levure (Parlati, McNew et al. 2000; Paumet, Rahimian et al. 2004). Cependant, des études *in vitro* (Fasshauer, Antonin et al. 1999; Yang, Gonzalez et al. 1999) et des essais de fusion des liposomes (Brandhorst, Zwilling et al. 2006) ont montré que les complexes SNAREs QabcR non recensés *in vivo* (en échangeant les syntaxines de deux complexes identifiés *in vivo* par exemple) présentaient les mêmes caractéristiques biophysiques (stabilité thermique, constantes d'association et dissociation, structure) que les complexes utilisés *in vivo* et étaient fonctionnels. De plus, des complexes atypiques sont également possibles : Qaaaa en antiparallèle, Qabab ou Qaabc en parallèle, et QabcR en antiparallèle (Linial 1997; Fasshauer 2003). Enfin, plusieurs exemples montrent qu'*in vivo* également, y compris dans un contexte où la spécificité paraît si évidente, comme celui de la levure, une SNARE peut en remplacer une autre. Ainsi les SNAREs-R Ykt6p et Sec22p peuvent se substituer pour le trafic RE-Golgi (Liu and Barlowe 2002). Il en va de même pour les SNAREs-Qbc SNAP-23 et SNAP-25, et pour les SNAREs-Qa VAMP2 et synaptobrénine 2 dans l'exocytose régulée des granules des cellules chromaffines (Sorensen, Nagy et al. 2003; Borisovska, Zhao et al. 2005). Enfin, plusieurs SNAREs interviennent à de multiples étapes du trafic comme Sed5p (Tsui and Banfield 2000), Ykt6p (Fischer von Mollard and Stevens 1999), et VAMP8 (Antonin, Holroyd et al. 2000; Wang, Ng et al. 2004). Ces observations ont ainsi remis en question le paradigme précédent : la spécificité observée *in vivo* ne serait pas due à une spécificité d'interaction entre les SNAREs elles-mêmes, mais plutôt à une spécificité de localisation (Figure 15) et à leur association avec d'autres facteurs (protéines de manteau, Rabs et effecteurs) (Jahn and Scheller 2006).

1.2.4.3 Quel est/sont le(s) rôle(s) des SNAREs ?

1.2.4.3.1 *Hors du complexe point de salut ?*

Dans une large mesure, les SNAREs sont libres dans les membranes et non associées à leurs partenaires de fusion. Elles interagissent alors avec de nombreuses protéines (synaptophysine (Pennuto, Bonanomi et al. 2003), manteau COPII (Mossessova, Bickford et al. 2003), AP-1(Peden, Park et al. 2001)) impliquées dans leur tri et leur trafic. Elles peuvent également intervenir dans les étapes d'arrimage vésiculaire en interagissant avec des FAs comme EEA1, et avec les Vps (« Vacuole protein sorting ») de classe C ou les VFT (« Vps

Figure 15. DIVERSITE DES SNARES ET LOCALISATION INTRACELLULAIRE.



LEGENDE.

Les SNAREs à l'instar des Rabs et de certains facteurs d'arrimage, sont associées à des compartiments spécifiques. Elles participent à la mise en place de cette compartmentation et à la régulation des échanges vésiculaires en contrôlant la fusion des vésicules avec leurs compartiments cibles. Les complexes SNAREs impliquent des protéines vésiculaires (v-SNAREs, VAMP) et cibles (t-SNAREs, syntaxines). L'association préférentielle de protéines VAMP avec des syntaxines données, détermine la spécificité de la fusion.

Fifty Three ») (Siniossoglou and Pelham 2001; Collins, Thorngren et al. 2005). Dans leur conformation libre, certaines VAMPs sont incapables de participer à un quelconque complexe SNARE du fait de l'indisponibilité de leur motif SNARE (Hu, Carroll et al. 2002; Kweon, Kim et al. 2002), et requièrent une activation par des protéines comme la synaptotagmine (Hu, Carroll et al. 2002) ou peut-être la Rho-GTPase Cdc42 (Nevins and Thurmond 2005). A l'inverse, la syntaxine 1 et SNAP-25 seraient constitutivement actives (Lang, Margittai et al. 2002). Un autre élément important à souligner, c'est l'abondance de ces deux SNAREs dans des tissus comme le cerveau, où chacune représente 1% des protéines exprimées (Walch-Solimena, Blasi et al. 1995), rendant peu surprenantes leurs interactions trouvées avec différents canaux qui représentent au total moins de 1% des protéines exprimées.

1.2.4.3.2 Une localisation membranaire particulière.

Il est apparu que les SNAREs avant association au sein de complexes SNAREs sont préalablement groupées dans des nanodomains riches en cholestérol (Chamberlain, Burgoyne et al. 2001; Lang, Bruns et al. 2001; Predescu, Predescu et al. 2005), où les associations en homodimères permettraient de faciliter ces regroupements (Laage, Rohde et al. 2000). Ce type de domaines permettraient de concentrer davantage les SNAREs et de définir des sites de fusion de plus haute probabilité pour les vésicules au moins dans le cadre de l'exocytose (Lang, Bruns et al. 2001). Cela n'est pas encore établi pour toutes les SNAREs ni tous les types de compartiments.

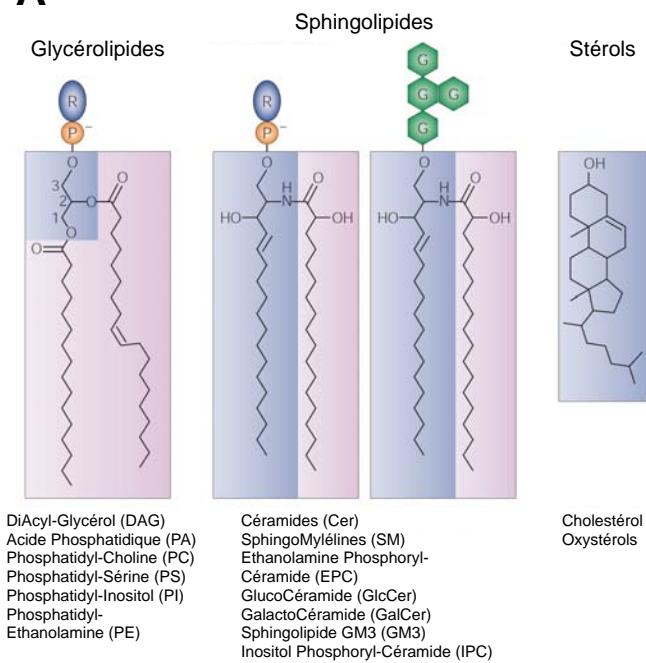
1.2.4.3.3 Fonction dans la fusion.

Dans un premier temps, on pensait que l'ATPase NSF permettait la fusion en désassemblant des complexes SNAREs préformés (Sollner, Bennett et al. 1993). L'idée que l'assemblage plutôt que la dissociation des complexes SNAREs était responsable de la fusion a également été suggérée (Sudhof, De Camilli et al. 1993). Il a cependant fallu que l'on comprenne que NSF n'était pas directement impliqué dans la fusion (Mayer, Wickner et al. 1996), et que des données structurales permettent de proposer le modèle de « zippering » des SNAREs (Hanson, Roth et al. 1997; Lin and Scheller 1997), pour que le rôle de l'assemblage des complexes SNAREs dans la fusion soit établi.

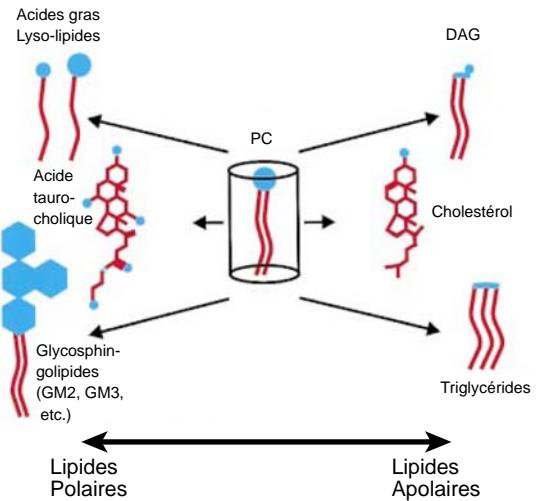
Actuellement le modèle de fonctionnement le plus consensuel est présenté à la figure 14B. les SNAREs libres seraient associées en complexes « accepteurs » très réactifs, stabilisés par les protéines de type SM (« Sec1p/Munc-18 »). Les vésicules une fois arrimées par des FAs et exposant leurs SNAREs, des complexes SNAREs lâches (amorçage ou « priming ») se formeraient en *trans*. Des protéines régulatrices comme les complexines (McMahon, Missler et al. 1995; Hu, Carroll et al. 2002) et les synaptotagmines

Figure 16. COMPOSITION LIPIDIQUE DES MEMBRANES

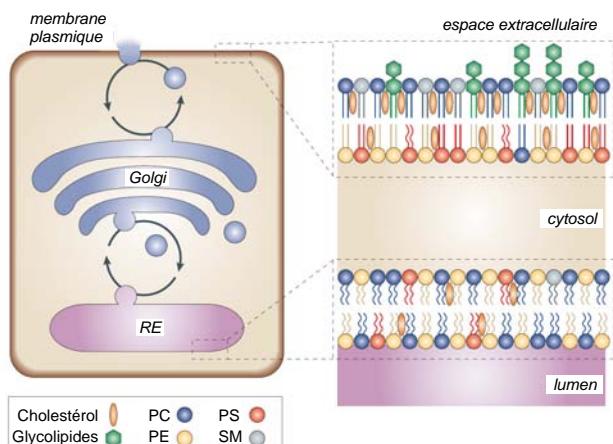
A



B



D



LEGENDE.

A : Les différentes classes de lipides membranaires et quelques membres de chaque famille.

B : La phosphatidylcholine (PC) est un pivot du métabolisme des lipides membranaires. C'est un phospholipide intermédiaire du point de vue des propriétés biochimiques et neutre vis à vis de la structure membranaire (il ne provoque pas de déstabilisation, de courbure, etc.). Les phospholipides pourvus de têtes polaires plus volumineuse que la PC ou présentant une partie hydrophobe ne comportant qu'un seul acide gras (à gauche), sont plus polaires et auront tendance à induire une courbure positive de la membrane (le LBPA en est un exemple). Les lipides qui au contraire sont dépourvus de groupement polaire (à droite) auront tendance à induire une courbure négative (cas du DAG typiquement).

C : Les différents lipides membranaires, leur lieu de synthèse, leur distribution préférentielle dans la cellule et dans les bicouches lipidiques.

D : Schéma représentant l'évolution de la bicouche lipidique de la membrane du RE à la membrane plasmique.

(Les abréviations sont consistantes entre les différents panneaux, cf. panneau A).

(Mehta, Battenberg et al. 1996; Martinez, Chakrabarti et al. 2000; Sollner 2003) faciliteraient la formation de complexes stables où les SNAREs sont étroitement associées, on parle alors d'ancre (« docking »).

Les étapes de la fusion proprement dite sont plus controversées selon les systèmes (neurones, levures, cellules épithéliales) et les écoles de pensée. Qui penche pour un rôle exclusif des SNAREs, qui pour l'existence d'un pore de fusion protéique de nature différente, ou pour un rôle prépondérant des lipides dans le processus, etc. Je reviendrai un peu sur cette question dans la partie sur la V-ATPase (partie 4 de cette introduction), et présenterait ici ce qu'on appelle « le modèle SNAREs » (Figure 14C).

D'une façon plus générale, il est plus ou moins admis que deux bicouches lipidiques qui fusionnent passent par une suite d'états transitoires où les membranes externe et interne de chaque bicouche se dissocieraient, passant par un état d'hémifusion, selon le modèle baptisé «stalk hypothesis» (Chernomordik and Kozlov 2003; Jahn, Lang et al. 2003; Chernomordik and Kozlov 2005). Dans ce contexte les SNAREs permettraient, en exerçant des tractions, de déformer les membranes et de forcer leur fusion. Tout d'abord en *trans*, les SNAREs faciliteraient la fusion des couches externes, puis en *cis*, celle des couches internes. Diverses prédictions vérifiées expérimentalement corroborent cette thèse (Grote, Baba et al. 2000; Kiessling and Tamm 2003; Knecht and Grubmuller 2003). Cependant, la force requise pour permettre des étapes critiques comme l'extension du pore de fusion, mettrait éventuellement en jeu trop de complexes SNAREs pour que ce soit compatible avec les échelles nanométriques des événements de fusion vésiculaire (Montecucco, Schiavo et al. 2005). D'où l'idée que d'autres facteurs seraient requis comme le secteur V0 de la V-ATPase (cf. 4.4).

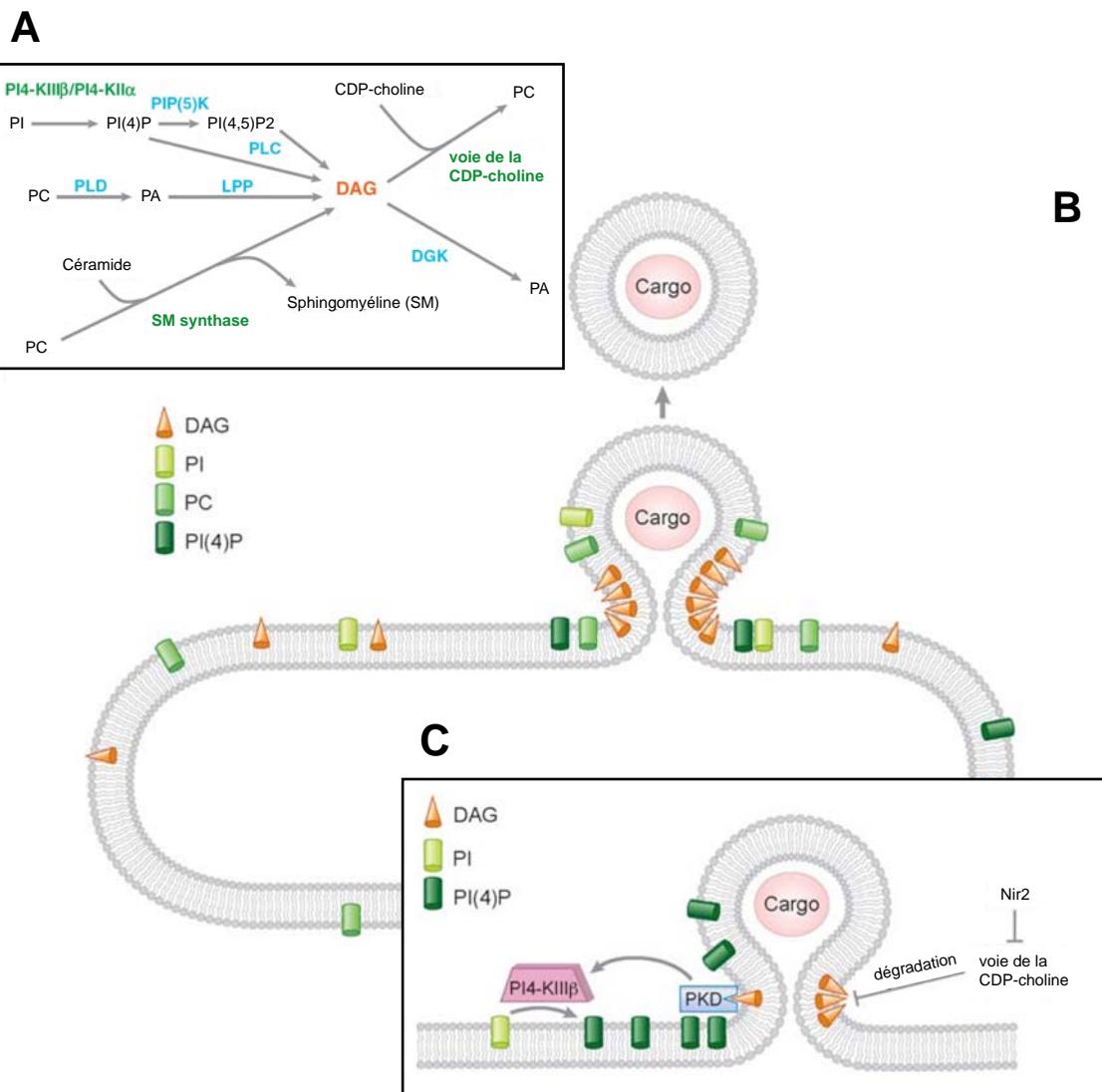
Dans l'ensemble, les SNAREs initieraient et accompagneraient la fusion jusqu'à son terme, mais probablement pas seules.

1.2.5 Tri et évolution de la composition membranaire.

1.2.5.1 Les compartiments ont des compositions lipido-protéiques distinctes.

De la membrane nucléaire, au REG, au REL, en passant par l'ERGIC et le Golgi, ainsi qu'au sein même de ce dernier compartiment, et jusqu'à la membrane plasmique, la composition lipido-protéique des membranes évolue (Holthuis and Levine 2005) (Figure 16). Par exemple la partie la plus en *trans* du Golgi possède une membrane plus épaisse, plus rigide et moins perméable, fortement enrichie en cholestérol, et en phosphatidylsérine sur sa couche cytosolique. Cette évolution est rendue possible par l'association préférentielle de

Figure 17. LIPIDES ET COURBURE MEMBRANAIRE L'EXEMPLE DU DIACYLGLYCEROL.



LEGENDE.

A : Le métabolisme du diacylglycérol (DAG) et des phosphoinositides. PI : phosphatidyl-inositol, PI(4,5)P₂ : phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphate, K : kinase, PLD : phospholipase D, PLC : phospholipase C, LPP : lysophosphatide phosphatase, PA : acide phosphatidique, DGK : DAG kinase, PC : phosphatidyl-choline, SM : sphingomyéline.

B : Schéma représentant la répartition de quelques phosphoinositides. Le DAG a une préférence pour les zones de courbure négative.

C : Régulation enzymatique de la composition en DAG au niveau d'une zone de bourgeonnement vésiculaire.

certaines protéines avec certaines fractions lipidiques, et par les tris qui ont lieu lors de la formation des vésicules réalisant les échanges entre ces différents compartiments (vésicules à clathrine à partir de la membrane plasmique et du TGN, vésicules COPII dans le sens antérograde RE-Golgi, et COPI dans le sens rétrograde à partir du Golgi). Ces tris se font spontanément du fait des propriétés biochimiques et structurales particulières des lipides et protéines que l'on retrouve dans les vésicules (cf. paragraphes suivants).

1.2.5.2 Les vésicules ne se forment pas n'importe où.

Comme cité plus haut, certains environnements lipidiques (riches en diacylglycérol ou en acide phosphatidique par exemple) sont favorables à l'initiation de la vésiculogenèse. L'activité localisée de phospholipases (Figure 17) mais aussi de flipases (Figure 18) influence cette composition et participe à la définition de zones membranaires où la vésiculogenèse est favorisée. Le recrutement d'adaptateurs et de protéines de manteau les stabilise par la suite. Ainsi, que ce soit à la membrane plasmique, au niveau du TGN, ou du RE, il existe des sites d'initiation de la vésiculogenèse qui sont relativement stables dans le temps. Ces sites sont les puits recouverts de la membrane plasmique, les sites de sortie du TGN et les sites de sortie du RE (ERES : « Endoplasmic Reticulum Exit Sites »).

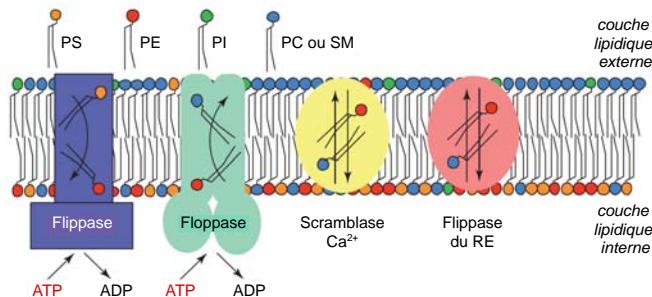
1.2.5.3 La vésiculogenèse génère un tri lipidique.

1.2.5.3.1 Les étapes d'une vésiculogenèse : l'exemple du manteau COPII.

Le bourgeonnement d'une vésicule est initié par la petite GTPase Sar1 (pour les manteaux COPI, c'est Arf1 qui joue ce rôle, et pour les manteaux à clathrine, c'est l'endophiline) liée au GTP (par l'action d'une GEF : « Guanine Exchange Factor ») qui insère une hélice amphipathique dans la couche externe de la membrane, provoquant une courbure positive de celle-ci (Lee, Miller et al. 2004; Bielli, Haney et al. 2005; Lee, Orci et al. 2005) (Annexe 12). La courbure est ensuite accentuée par le complexe Sec23/Sec24 qui forme un moule auquel la membrane est contrainte de s'adapter par attraction électrostatique (Bi, Corpina et al. 2002). Vient ensuite l'engagement du bourgeon vésiculaire par les complexes Sec13/Sec31 qui permet d'aboutir à une structure sphérique impossible à obtenir en l'absence de ce dernier complexe (Stagg, Gurkan et al. 2006). L'étape la moins bien élucidée mais en passe de l'être reste la fission de la vésicule cagée. Des indications récentes suggèrent que Sar1-GTP est à nouveau requise avec son hélice amphipathique N-terminale à cette étape, peut-être en restreignant le diamètre du cou qui relie RE et vésicule en formation (Lee, Orci et al. 2005; Antonny 2006). L'hydrolyse du GTP par Sar1 en GDP +

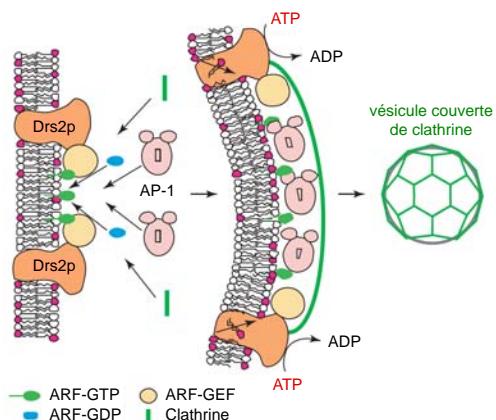
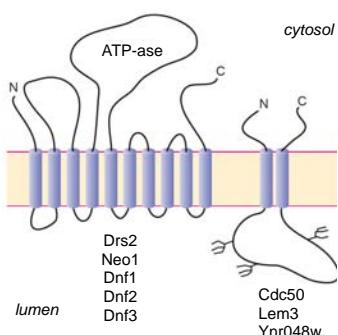
Figure 18. FLIPPASES ET ASYMETRIE MEMBRANAIRE.

A Les différents types de flippases et leurs substrats lipidiques.



C Rôle de Drs2 dans la vésiculogenèse.

B Topologies des flippases.



LEGENDE.

A : Les flippases sont impliquées dans les échanges de lipides entre les deux couches d'une membrane lipidique. Elles se distinguent par leur mode de fonctionnement : ATP-dépendant ou non, Calcium-dépendant, etc., leur localisation (RE, Golgi, TGN, membrane plasmique) et leurs substrats lipidiques. Les flippases strictes catalysent le transport de la phosphatidylserine (PS) et de la phoshatidyléthanolamine (PE) de la couche externe (luménale ou extracellulaire) à la couche interne de la membrane. Les floppases réalisent l'échange inverse avec une cintéique plus lente et peuvent aussi bien le faire pour les différents phospholipides. La scramblase est activée par un afflux de calcium et favorise l'échange des phospholipides selon leur gradient entre les deux couches lipidiques, provoquant donc une homogénéisation des deux couches. Les flippases du RE ne requièrent pas d'apport extérieur d'énergie et favorisent également une homogénéisation des contenus des deux couches. Les flippases ATP-dépendantes comme Drs2 sont des P-ATPases tandis que les Floppases sont des transporteurs de type ABC ("ATP-Binding Cassette"). PI=phosphatidylinositol, PC=phosphatidylcholines, SM=sphingomyélines.

B : Topologies de deux grands types de flippases. Les flippases correspondant aux deux types de topologies sont indiquées en dessous de celles-ci.

C : Exemple de la contribution de Drs2 à la courbure membranaire lors de la vésiculogenèse dépendante de ARF-GTP. Les phospholipides à tête polaires sont transloqués de la couche interne à la couche externe grâce à l'énergie d'hydrolyse de l'ATP.

Pi est peut-être aussi nécessaire pour déstabiliser la bicouche lipidique au niveau de ce cou, et favoriser ainsi la fission (Bielli, Haney et al. 2005; Antonny 2006).

1.2.5.3.2 Comment est modifiée la composition lipidique ?

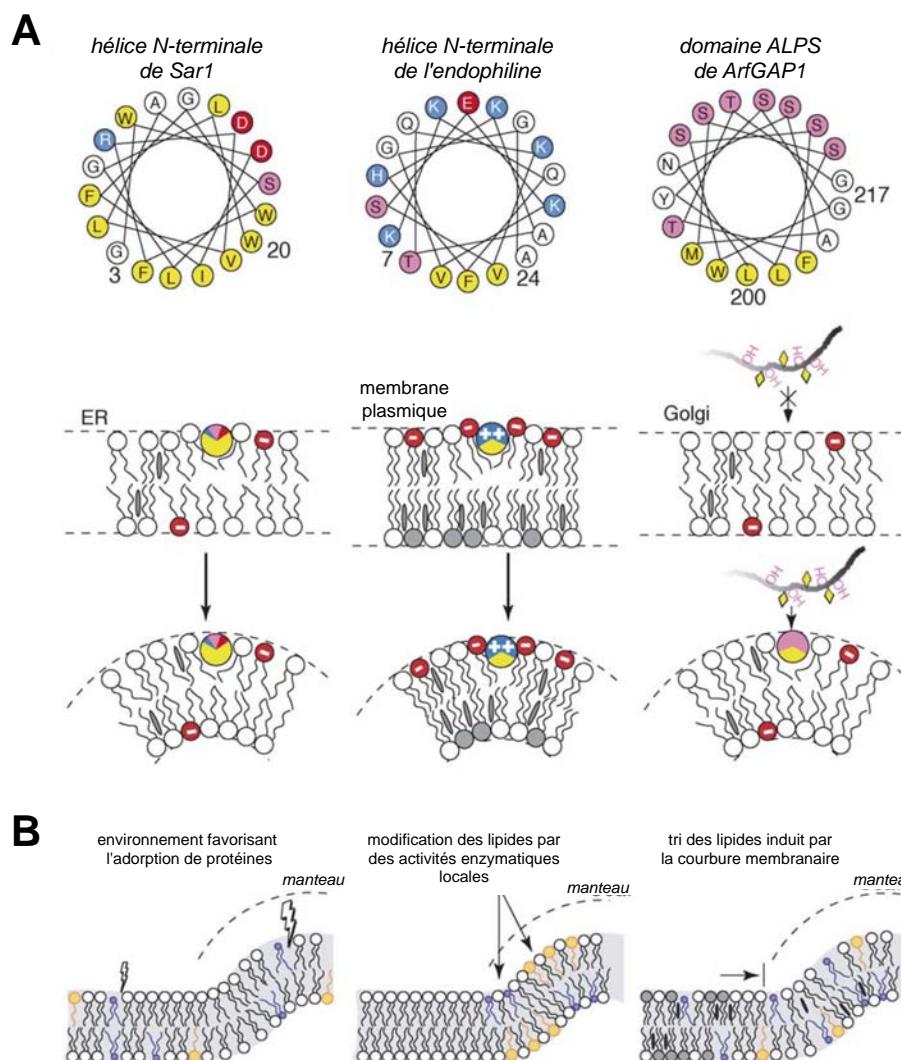
Tout d'abord, au cours de la première étape de la vésiculogenèse à la membrane plasmique (vésicules à clathrine de l'endocytose, cf. 2.3.1) au niveau du RE (vésicules COPII) ou au niveau du *cis*-Golgi (vésicules COPI), les phénomènes de courbure membranaire mis en jeu provoquent des changements locaux de la composition membranaire lipidique, par des mécanismes de tension, des attractions de types hydrophobe ou électrostatique, entre les lipides et entre lipides et protéines (Holthuis and Levine 2005; Antonny 2006) (Annexe 8). Certains lipides comme le DAG (« DiAcylGlycérol ») diffusent dans les zones de courbure négative, et favorisent cette conformation (Figure 17). D'autres processus comme des modifications enzymatiques des lipides (Figure 19B) et des translocations entre les deux couches de la membrane (catalysées par des P-ATPases ou flipases) (Raggers, Pomorski et al. 2000) (Figure 18) contribuent aussi largement à créer cette asymétrie de composition membranaire (Holthuis and Levine 2005) (Figure 16).

Au final, la composition des vésicules diffère sensiblement de celle du compartiment donneur et ressemble davantage à celle de l'accepteur.

1.2.5.4 La vésiculogenèse génère un tri protéique.

La formation d'une vésicule induit également des contraintes stériques dues à la forte courbure de la membrane bourgeonnant, au faible diamètre de ce type de compartiment, et à l'encombrement qui règne au niveau du col. De ce fait certains gros complexes ou assemblages protéiques (comme les kératines ou les collagènes à la sortie du Golgi) sont nécessairement exclus (Mironov, Mironov et al. 2003) ou diffusent mal et se trouvent sous-représentés dans les vésicules comparativement au compartiment « donneur ». Cette disparité est considérablement renforcée par les interactions avec les lipides et les autres protéines déjà asymétriquement réparties. Les caractéristiques d'hydrophobicité, de sensibilité à la courbure (cas des protéines à domaine BAR ou ALPS, cf. 1.4.6.2), d'affinité pour certains domaines membranaires, etc. conduisent certaines protéines à ségrégner ensemble ou concomitamment avec certains lipides. Les protéines liées au GPI (Brown and Rose 1992; Fivaz, Vilbois et al. 2002; Polishchuk, Di Pentima et al. 2004; Sharma, Varma et al. 2004) et les protéines Hedgehog liées au palmitate et au cholestérol (Chen, Li et al. 2004; Panakova, Sprong et al. 2005; Eaton 2006) ont par exemple une préférence pour les domaines riches en cholestérol et les radeaux lipidiques en particulier.

Figure 19. INITIATION DE LA VESICULOGENESE ET MODIFICATIONS LOCALES DES LIPIDES.



LEGENDE.

A : Les résidus hydrophobes (en jaune) interagissent avec les chaînes aliphatiques des lipides tandis que les résidus de charge positive (en bleu) interagissent avec les têtes polaires des lipides chargés négativement (en rouge). Séries et thréonines sont indiquées en rose. Selon la taille de la surface hydrophobe de l'hélice et la distribution des charges, ces motifs amphipathiques sont adaptés à des environnements membranaires différents dans lesquels ils peuvent induire (cas de Sar1 et de l'endophiline) ou seulement reconnaître une courbure membranaire donnée. Sar1 et les protéines à domaine ALPS requièrent une certaine fluidité membranaire favorisée par des lipides "coniques" (comme le diacylglycérol par exemple, DAG).

B : Certaines voies du métabolisme des lipides déterminent les concentrations de ces lipides "coniques" (en bleu) pour créer un environnement membranaire favorable à l'adsorption de protéines (à gauche). Dans ce cas ce n'est pas la géométrie des lipides qui dicte la courbure de la membrane. A l'inverse, lorsque la courbure membranaire résulte d'une activité enzymatique localisée, la forme de la membrane respecte la géométrie des lipides (au centre). Enfin, lorsque la courbure est induite par un manteau protéique par exemple, certains lipides sont libres de diffuser et d'autres non (cas des sphingolipide en gris), "préférant" les bicouches plates et compactes (à droite).

1.2.5.5 Trafic vésiculaire inter-compartiments : contribution des manteaux COP et des complexes SNAREs à la mise en place et au maintien de compositions membranaires distinctes.

A la fois les SNAREs présentent une certaine spécificité de reconnaissance et d'association entre elles, et les manteaux COP ont des adaptateurs et des cargos préférentiels. La combinaison des deux permet de générer des vésicules de contenu déterminé, et possédant une spécificité d'adressage, capable de générer un tri et d'alimenter des zones particulières d'un compartiment pour maintenir leur composition. Mais en plus de cela, il existe une sélectivité des protéines de manteau COP pour certaines SNAREs (Matsuoka, Morimitsu et al. 1998; Peng, Grabowski et al. 1999; Allan, Moyer et al. 2000; Rein, Andag et al. 2002; Mossessova, Bickford et al. 2003), ce qui renforce la spécificité de l'échange. En outre, le complexe COPII par exemple ne se contente pas de s'associer préférentiellement avec les SNAREs Bet1, Sed5, Bos-1 et Sec22, mais les fixe dans une conformation facilitant la fusion homotypique (avec le RE) ou hétérotypique (avec le Golgi) de la vésicule COPII avec la membrane du compartiment accepteur (Mossessova, Bickford et al. 2003).

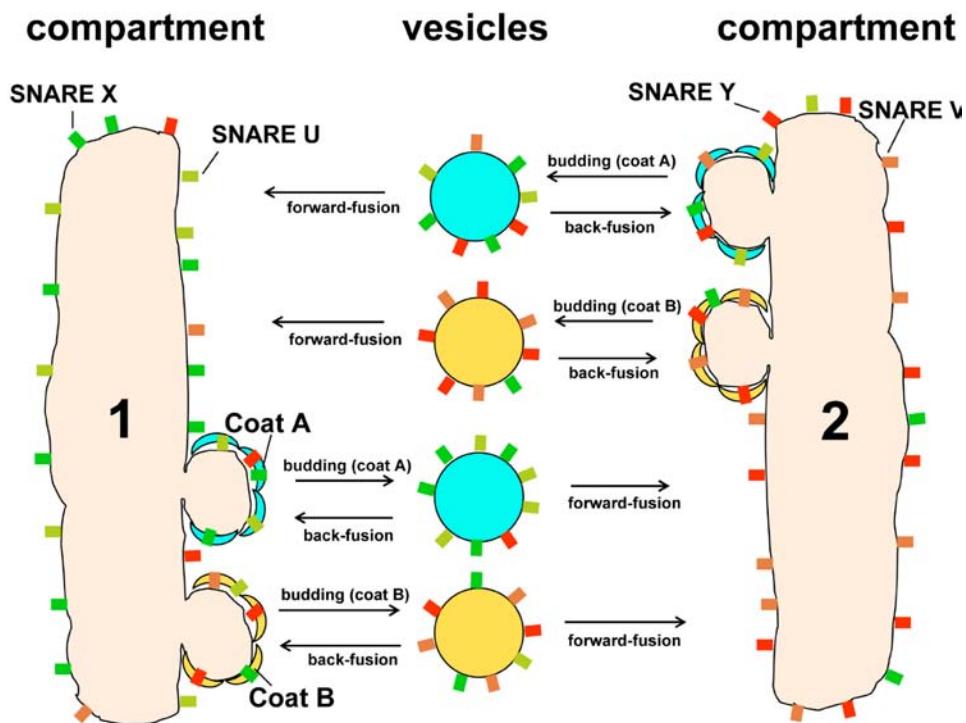
En fait le trafic vésiculaire différentiel est non seulement responsable des échanges entre et du maintien de compartiments différents (Heinrich and Rapoport 2005) (Figure 20), mais est aussi probablement à l'origine de leur formation. Le Golgi peut ainsi être reconstitué de novo à partir du RE (Guo and Linstedt 2006).

1.2.6 Importance des modifications post-traductionnelles, et des hélices peptidiques lipophiles.

1.2.6.1 Modifications post-traductionnelles.

L'ensemble des processus de tri et d'adressage que l'on vient de voir repose en partie sur la capacité des GTPases à s'associer à la bicoche lipidique. Ce sont les groupements ajoutés post-traductionnellement aux petites GTPases par prénylation (géranylgeranyle, palmitoyle, farnésyle) (Figure 8B) qui permettent leur ancrage dans des environnements lipidiques donnés, et d'induire des modifications de courbure membranaire (Figure 19A). Les protéines cargo ancrées au GPI, et celles couplées à différents acides gras, ou à des stérols comme les protéines de type Hedgehog (modifiées par palmitoylation en N-ter et par le

Figure 20. MAINTENIR 2 COMPARTIMENTS DISTINCTS GRACE AUX SNARES ET AUX PROTEINES DE MANTEAU



LEGENDE.

Voici le système minimal permettant d'expliquer le maintien de deux compartiments de compositions distinctes et qui échangent des vésicules. Les auteurs de l'article cité en bas de cette page montrent qu'un système à deux couples de SNAREs (v-SNAREs et t-SNAREs) associés à deux compartiments différents (pouvant être RE et Golgi) qui échangent des vésicules recouvertes par deux types de manteaux (par exemple COPII et COPI) possédant chacun une préférence pour un couple de SNAREs, suffit à expliquer que les compartiments se différencient par l'échange de vésicules et ne s'homogénéisent pas. Le modèle prévoit que les vésicules qui bourgeonnent peuvent soit refusionner à leur compartiment d'origine de façon homotypique (définissant ainsi des sites de sortie), soit tenter de fusionner avec l'autre compartiment. Les auteurs montrent que ce système évoluera vers un système d'échanges où un type de manteau détermine l'échange 1-2 et l'autre l'échange 2-1, comme dans le cas des échanges RE - Golgi.

cholestérol en C-ter) s'associent également préférentiellement à certains domaines lipidiques, comme les radeaux lipidiques riches en cholestérol, mais j'y reviendrai plus loin.

1.2.6.2 Structures peptidiques lipophiles.

Si l'on reprend l'exemple des Rab-GTPases, les deux groupements palmitoyle ajoutés à leur queue C-ter sont davantage importants pour leur ancrage à la bicoche membranaire (et pour certaines à l'initiation d'une courbure membranaire), que pour la spécificité d'association avec un compartiment donné. Cette spécificité repose en fait sur la séquence peptidique de la partie hypervariable de leur queue C-ter qui forme une hélice aliphatique capable de discriminer les compositions lipidiques des différents compartiments. Ainsi, un compartiment donné est enrichi en un type particulier de Rab, générant une asymétrie qui est amplifiée par le recrutement de facteurs spécifiques de la Rab concernée.

D'autres protéines impliquées dans la dynamique des compartiments comportent également des structures protéiques d'interaction avec des environnements membranaires définis. Il en va ainsi des protéines à domaine BAR (« BIN/Amphiphysine/RV5 ») (Habermann 2004; Zimmerberg and McLaughlin 2004; Gallop and McMahon 2005; Dawson, Legg et al. 2006; Ren, Vajjhala et al. 2006) comme l'Arfaptine 2 (effecteur des GTPases Rho et Arf), des Centaurines β , des Oligonephrines, des SNXs (« Sorting-NeXins »), des Amphiphisines, des Endophilines, et des adaptateurs APPL1 et APPL2, qui s'associent à des domaines membranaires présentant une courbure donnée. On peut citer également les protéines à domaine ENTH (« Epsin N-Terminal Homology domain ») (Kweon, Shin et al. 2006), à domaine ALPS (« ArfGAP1 Lipid Packing Sensor ») (Bigay, Casella et al. 2005), ou le cas de la phospholipase C et de son domaine C1 (Ho, Slater et al. 2001).

2 Sécrétion et endocytose dans les cellules polarisées : quelles relations ?

2.1 Trafic intracellulaire orienté et polarité.

Ayant travaillé sur des cellules polarisées (epithelia de *C. elegans*), il m'a semblé important d'introduire la notion de polarité cellulaire et des modèles de cellules polarisées qui ont contribué significativement à la compréhension du trafic intracellulaire.

2.1.1 Considérations générales.

Le métabolisme cellulaire requiert des conditions variées de pH, salinité, concentrations de divers substrats, catalyseurs, cofacteurs, régulateurs, selon les réactions concernées. Entre autres, dans un système capable d'absorber des intrants variés en termes de taille, composition, propriétés physicochimiques, et d'excréter également des produits toxiques pour le métabolisme cellulaire, pouvoir séparer les milieux réactionnels est un enjeu important. La compartimentation des cellules eucaryotes est une réponse à ces impératifs puisqu'elle permet de ménager des environnements réactionnels isolés par des membranes lipidoprotéiques à travers lesquelles le trafic est régulé. L'existence de compartiments permet même de pousser le système cellulaire plus loin en créant des environnements absolument incompatibles avec la plupart des fonctions cellulaires essentielles (compartiments très acides, compartiments de stockage de cations comme le calcium, etc.), et qui autorisent donc un éventail de réactions cellulaires plus large. De plus, cela confère un degré de complexité et donc un niveau de régulation supplémentaires. En revanche, une telle organisation à des coûts : elle nécessite un investissement énergétique plus important, et induit une pénalité en termes de célérité des échanges intracellulaires puisqu'il ne s'agit plus simplement de diffusion mais de processus régulés impliquant des véhicules complexes comme des vésicules. On peut également penser que le fait que ces échanges soient orientés est un prérequis pour la viabilité d'un tel « choix évolutif », dans un souci d'efficacité.

2.1.2 La cellule eucaryote est un système « polarisé » par nature.

Si l'on considère une cellule eucaryote, son fonctionnement est centrifuge pour l'exocytose et centripète pour l'endocytose. On a donc bien là un système « polarisé » : du noyau à la membrane plasmique dans le premier cas, et de la membrane plasmique à des compartiments internes endolysosomaux dans le second. Il s'agirait d'une « polarité centro-péphérique ». D'une certaine manière, toute cellule eucaryote et dans une moindre mesure procaryote, possède une polarisation à géométrie plus ou moins variable. Dans la mesure où l'on a deux milieux cellulaire et extracellulaire différents séparés par une membrane, on est face à un système asymétrique qui induit une polarisation des échanges. Dans la suite de ce paragraphe, je distinguerai la terminologie classique de l'idée que j'évoque ici et que je prendrai la précaution de mettre entre guillemets.

2.1.3 Qu'appelle-t-on cellules polarisées ?

2.1.3.1 La définition classique.

Une cellule est dite polarisée lorsque sous l'influence de signaux externes (mécaniques, chimiques, lumineux) ou internes (concentration locale de certains composés, activité localisée de certains régulateurs) apparaît une asymétrie morphologique et/ou biochimique dans sa membrane plasmique. Cette polarité peut donc être stable dans le temps et l'espace (epithelia, neurones), ou transitoire (cellule en division : zygote, levure, cellule en migration : neutrophiles) (Annexe 13).

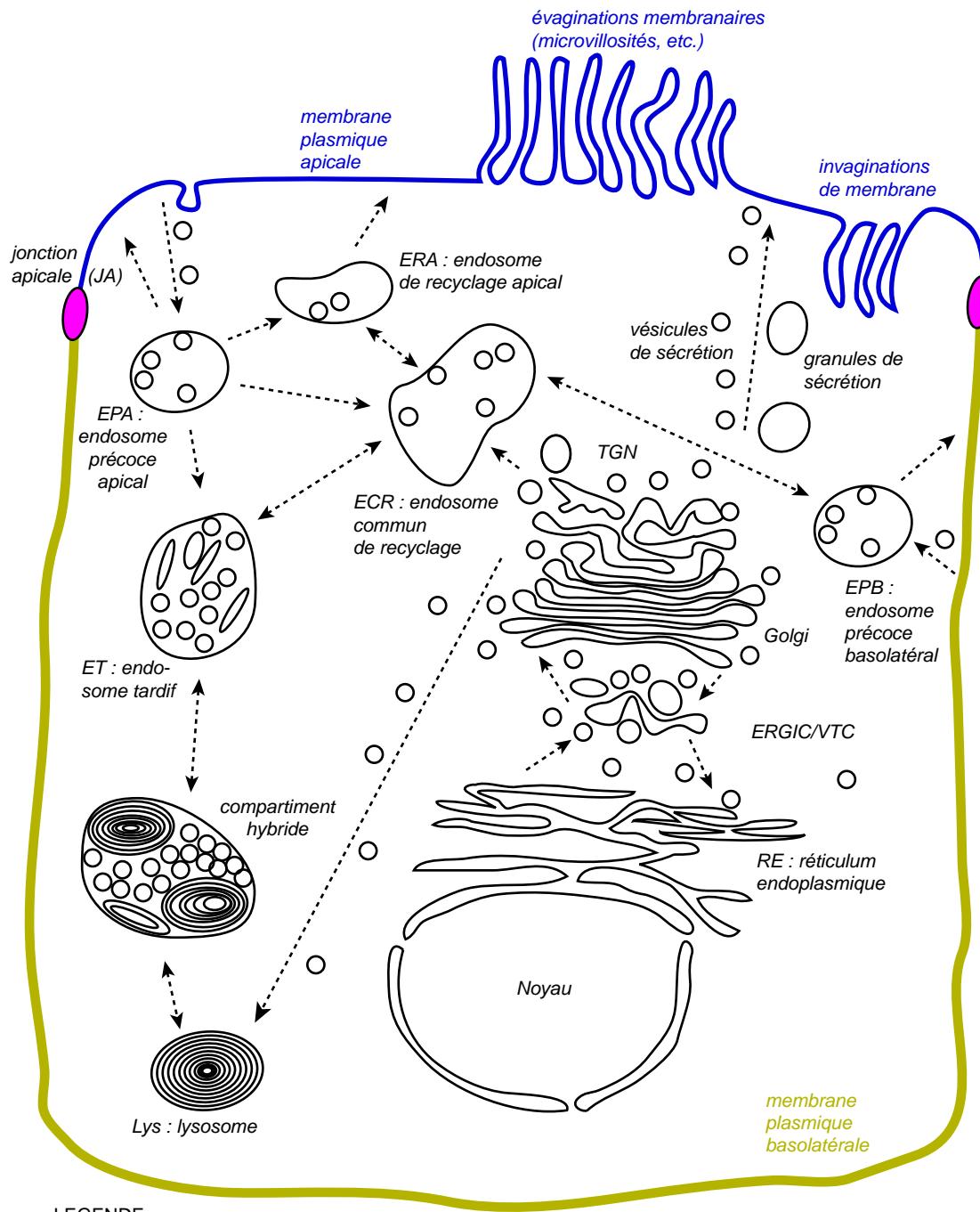
2.1.3.2 Quelques cellules polarisées très étudiées.

2.1.3.2.1 *Les cellules MDCK (« Madin-Darby Canine Kidney »), cellules épithéliales.*

Les cellules MDCK sont issues d'une lignée transformée d'épithélium rénal de cocker spaniel qui peuvent être cultivées en monocouche en conservant leurs propriétés de cellules épithéliales (Cereijido, Robbins et al. 1978; Simons 1987).

Les cellules épithéliales sont caractérisées par une organisation en monocouche de cellules solidaires grâce à des jonctions apicales (jonctions serrées, jonctions adhérentes, jonctions « gap », desmosomes) (Annexe 13, Figure 21) qui définissent une polarité apico-basale en prévenant les échanges entre les membranes apicale et basolatéral de

Figure 21. LES CELLULES EPITHELIALES, CELLULES POLARISEES.



LEGENDE.

Schéma d'une cellule épithéliale. Les cellules épithéliales présentent deux membranes apicale et basolatérale de compositions différentes, séparées par des jonctions apicales (JA). Ces membranes peuvent présenter des microvillosités, extensions de membranes, ou des invaginations membranaires, plutôt du côté apical. Des voies de sécrétion apicales et basolatérale impliquant des endosomes précoce apical (EPA) et basolatéral (EPB) coexistent dans ces cellules, et se rejoignent au niveau de l'endosome commun de recyclage (ECR). A ce niveau convergent également la voie biosynthétique en provenance du Golgi/TGN et la voie de dégradation vers les endosomes tardifs (ETs) et lysosomes (Lys). La sécrétion peut faire intervenir des compartiments de type vésicule, granule ou des compartiments de type endolysosomale (corps lamellaires, corps multivésiculaires) non représentés ici (leur identité est difficile à définir).

compositions lipidoprotéiques différentes. De plus ces cellules reposent sur une lame basale du côté basal et sont au contact du milieu extérieur du côté apical. Les cellules épithéliales réalisent généralement des échanges osmotiques et nutritifs importants avec le milieu extérieur et possèdent souvent une membrane apicale dont la surface est considérablement étendue par des microvillosités (cellules intestinales de *C. elegans*), des canalicules (cellule excrétrice de *C. elegans*), des invaginations (cellules épidermiques de *C. elegans*) ou extensions membranaires, etc.

A cet égard, les cellules MDCK ne font pas exception, elles possèdent des villosités (cf. Annexe 13) qui permettent d'augmenter leur surface d'échange apicale. Les cellules MDCK ont été un modèle cellulaire d'étude de la sécrétion polarisée déterminant pour le trafic des protéines liées au GPI (Lisanti, Caras et al. 1989; Polishchuk, Di Pentima et al. 2004; Hua, Sheff et al. 2006), des signaux d'adressage basolatéraux (Brewer and Roth 1991; Hunziker, Harter et al. 1991; Nabi, Le Bivic et al. 1991; Matter, Hunziker et al. 1992; Hunziker and Fumey 1994; Simmen, Honing et al. 2002) ou apicaux (Scheiffele, Peranen et al. 1995; Yeaman, Le Gall et al. 1997; Takeda, Yamazaki et al. 2003), mais aussi du rôle des endosomes de recyclage dans la sécrétion (Brown, Wang et al. 2000; Wang, Brown et al. 2000), et de façon générale dans l'étude du trafic différentiel dans les cellules polarisées (Gibson, Futter et al. 1998).

2.1.3.2.2 Autres modèles de cellules épithéliales pour l'étude du trafic différentiel.

D'autres modèles ont aussi été utilisés avec succès pour des voies de trafic particulières. Un des plus vieux modèles est certainement la cellule acineuse du pancréas exocrine qui a permis la mise en évidence de la voie de biosynthèse protéique et de sécrétion des granules de zymogène par autoradiographie, notamment par le groupe de George Palade (Caro and Palade 1964; Vanheyningen 1964) puis l'étude de la sécrétion régulée par le calcium (Castle 1990; Gaisano 2000; Thevenod 2002; Wasle and Edwardson 2002). On peut aussi citer la sécrétion lente du surfactant par les cellules épithéliales alvéolaires de type II (Dobbs 1990; Batenburg 1992; Dietl and Haller 2000; Dietl, Haller et al. 2001; Rooney 2001), le trafic des lipoprotéines dans les cellules intestinales CaCo-2 (Rousset 1986; Hauri and Matter 1991; Levy, Mehran et al. 1995; Levy and Bendayan 2000) et les cellules hépatiques HepG2 (Dashti and Wolfbauer 1987; Dixon and Ginsberg 1993; Wilton and Matthews 1996; Zegers and Hoekstra 1998; Hoekstra, Zegers et al. 1999; Rhainds and Brissette 1999; Van, Maier et al. 2000), ou la phagocytose dans les cellules pigmentaires de la rétine (Marmorstein 2001). La sécrétion des protéines du lait a été étudiée dans les cellules épithéliales mammaires, etc.

2.1.3.2.3 L'étude de la sécrétion de neuromédiateurs dans les cellules en culture.

Les cultures de neurones d'hippocampe sont utilisées pour étudier la sécrétion régulée dans des cellules polarisées (Huttnner and Dotti 1991; Cameron, Mundigl et al. 1993; de Hoop and Dotti 1993; Burack, Silverman et al. 2000; Takeda, Yamazaki et al. 2003; Horton, Racz et al. 2005; Alberts, Rudge et al. 2006). Cependant leur manipulation délicate les a rendu moins populaires que les cellules chromaffines tumorales (non polarisées) PC12 (« PheoChromocytoma cells 12 ») capables de sécréter acétylcholine et catécholamines (Schubert and Klier 1977) stockées dans des vésicules à cœur dense (DCVs pour « Dense Core Vesicles ») (Melega and Howard 1984) et libérées de façon régulée par le calcium (Schweitzer 1993; Chen, Scales et al. 2001; Martin and Grishanin 2003). Ainsi les questions de trafic polarisé en culture cellulaire de vertébrés sont principalement l'apanage des lignées épithéliales.

2.1.3.2.4 La levure *Saccharomyces cerevisiae* en division.

Lors de chaque cycle de division, la levure *S. cerevisiae* initie ce processus en formant un bourgeon alimenté par une exocytose définie comme apicale (par convention) qui donnera la cellule fille. C'est un système de polarisation transitoire mais néanmoins très fort (Annexe 13). Le site d'initiation du bourgeonnement ne paraît pas lié à un domaine membranaire particulier et serait initié par un enrichissement local aléatoire en GTPase Cdc42 (Wedlich-Soldner, Altschuler et al. 2003). Ce modèle a été utilisé par Peter Novick et Randy Schekman pour l'isolement des mutants Sec1 à Sec23 (Novick, Field et al. 1980). Depuis, en raison de sa commodité pour les techniques génétiques, pharmacologiques, biochimiques que l'on peut appliquer à ce système, la levure a permis de mettre en évidence le rôle des GTPases dans le trafic intracellulaire (Salminen and Novick 1987; Segev, Mulholland et al. 1988; Nakano and Muramatsu 1989; Stearns, Willingham et al. 1990), celui des SNAPs (Clary, Griff et al. 1990), des GGAs (Dell'Angelica, Puertollano et al. 2000; Hirst, Lui et al. 2000), des protéines VPS (Raymond, Howald-Stevenson et al. 1992), de l'exocyste (TerBush, Maurice et al. 1996). Le modèle levure a en fait contribué à la plupart des découvertes sur le trafic cellulaire différentiel et permis de définir les rôles de nombreuses protéines. Notamment, grâce au processus de fusion homotypique des vacuoles, ont été mis en évidence l'implication des SNAREs dans la fusion (Nichols, Ungermann et al. 1997), et celui du secteur V0 de la V-ATPase (Muller, Bayer et al. 2002; Bayer, Reese et al. 2003).

2.1.3.3 Une cellule polarisée est « multi-polarisée »

Considérant ce que j'ai évoqué au point 2.1.2, une cellule dont certains domaines membranaires seraient exposés à des environnements différents de ceux d'autres domaines, serait automatiquement « multi-polarisée ». Ainsi une cellule épithéliale, en

surface d'un organisme multicellulaire est au contact de l'environnement interne (pôle basolatéral) et de l'environnement externe (pôle apical). Elle possède effectivement deux membranes différentes isolées par des jonctions qui préviennent leur interpénétration. C'est la cellule polarisée par excellence dans la terminologie classique. C'est en fait une cellule dotée d'une « polarité centro_périphérique » et d'une polarité axiale apico-basale ou baso-apicale. Par extrapolation, toute cellule en contact avec des tissus différents et entretenant des contacts de nature différente au niveau de domaines membranaires distincts, est « multi-polarisée ». Le cas des neurones et de leurs multiples interactions avec des neurones de types différents, est par exemple frappant puisque chaque synapse peut définir un axe polarisant, même s'il existe une polarisation maîtresse (axe « axone-corps cellulaire/dendrites »). On peut également citer le cas de la cellule excrétrice de *C. elegans*, qui possède une forme en H définissant des tubes qui croissent dans le sens antéropostérieur et postéro-antérieur à partir du corps cellulaire, et qui possèdent également une polarité apico-basale : la membrane apicale est en contact avec le lumen, et la membrane basolatérale avec le milieu intérieur du ver. Cette cellule a donc deux axes de polarité, au moins pendant la croissance des canaux. Enfin, un concept important en développement et particulièrement pour la mise en place des organes sensoriels chez la drosophile, est celui de polarité planaire, dans un plan parallèle à l'axe apico-basal (Klein and Mlodzik 2005).

2.1.3.4 « Multipolarité » et diversité des compartiments intracellulaires.

Si j'ai souhaité présenter les choses sous cet angle, c'est qu'il m'a semblé limité d'envisager le trafic intracellulaire de façon bipolaire ou apolaire. Il faut peut-être chercher dans une vision multipolaire de la cellule la raison de la diversification des compartiments endosomaux et sécrétoires terminaux que je présente dans les points 2.2 à 2.4. En effet, l'existence de domaines membranaires différents associés à des voies de signalisation différentes ou des fonctions différentes, requiert un trafic intracellulaire différencié pour maintenir ces dissymétries. Inversement, l'existence de ces dissymétries (qui peut dépendre aussi de signaux extérieurs) entretient probablement également les voies de trafic associées aux différents domaines membranaires.

2.1.4 Les déterminants apicaux et basolatéraux dans la sécrétion polarisée.

2.1.4.1 Des complexes protéiques « pôle-spécifiques » ?

2.1.4.1.1 Complexes AP (« Adaptor Protein »)

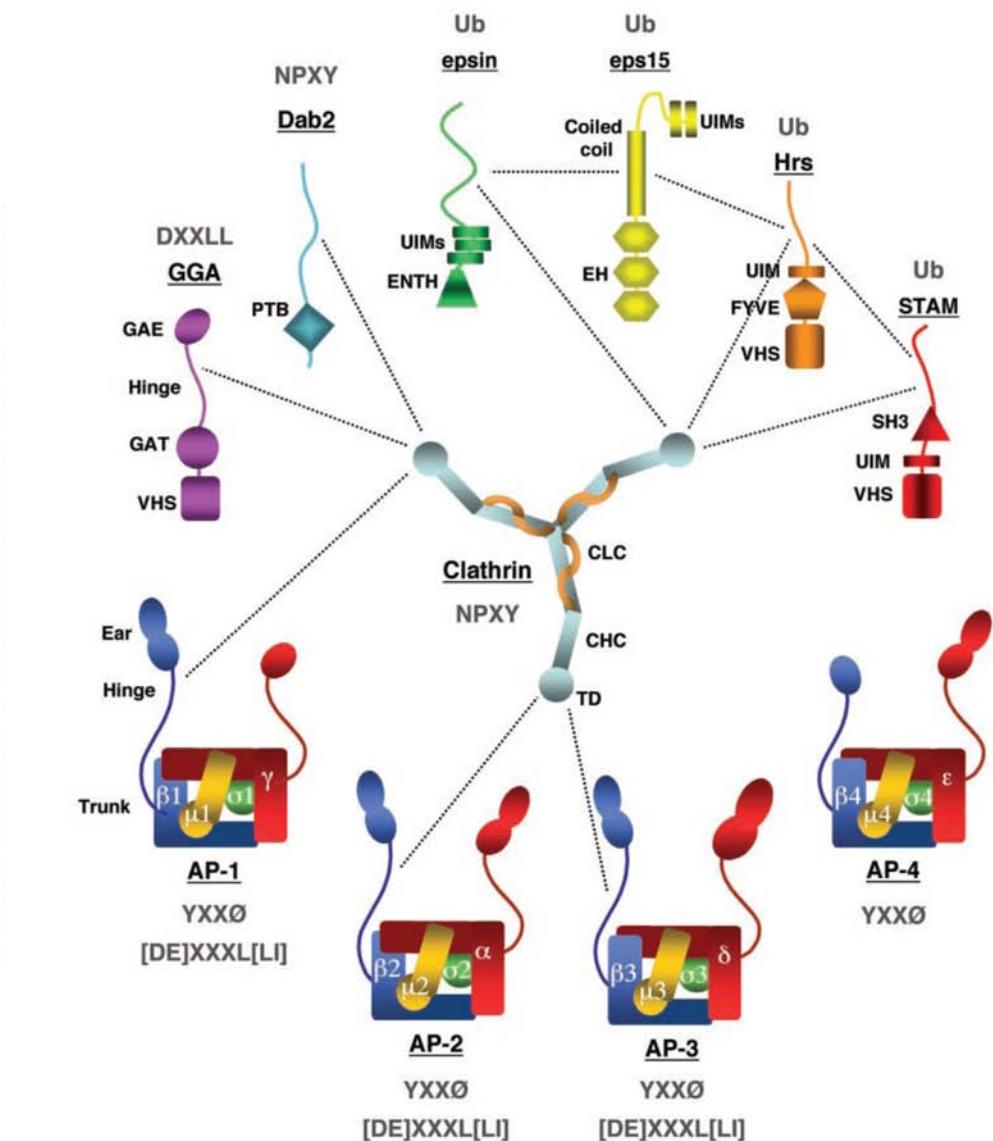
Le trafic intracellulaire fait intervenir de nombreux complexes aux localisations membranaires plus ou moins strictes (Rabs, adaptateurs, FAs, SNAREs, etc.). Parmi ceux-ci les complexes adaptateurs AP-1 à AP-4 sont impliqués dans l'endocytose (AP-2), les échanges entre compartiments endosomaux, et avec le TGN (AP-1, -3, -4). Ils seraient également associés au trafic à la membrane basolatérale dans les cellules polarisées. Ceci explique que les mêmes motifs peptidiques servent à l'adressage aux endosomes/lysosomes et à la membrane basolatérale (Annexe 14 et Figure 22).

Ainsi, le complexe adaptateur AP-1B (AP-1 contenant la sous-unité $\mu 1B$ spécifique des cellules épithéliales) dans les cellules MDCK a été identifié comme un complexe adaptateur spécifique de l'adressage basolatéral (Folsch, Ohno et al. 1999; Ohno, Tomemori et al. 1999). En effet en l'absence de $\mu 1B$, différentes protéines basolatérales (TfR et LDL) ne sont pas correctement adressées à cette membrane dans les cellules LLC-PK1, et ce défaut est sauvé par la transfection de $\mu 1B$ (Roush, Gottardi et al. 1998; Folsch, Ohno et al. 1999). De plus $\mu 1A$ (pour l'adressage aux endosomes et lysosomes) et $\mu 1B$ (pour l'adressage à la membrane basolatérale) présentent des localisations distinctes au niveau du TGN (Folsch, Pypaert et al. 2001). Si la découverte de $\mu 1B$ permet d'expliquer l'adressage basolatéral des protéines à motif tyrosine, rien de similaire n'explique encore l'adressage basolatéral plutôt qu'endoso-lysosomal des protéines à motif dileucine de la membrane basolatérale. Plus récemment, il a été montré que l'absence d'AP-4 induisait une délocalisation partielle des récepteurs aux LDL normalement basolatéraux (Simmen, Honing et al. 2002). Sa collaboration avec AP-1B est envisagée (Folsch 2005).

2.1.4.1.2 L'exocyste.

Le complexe AP-1B a également la particularité, au niveau des endosomes de recyclage basolatéraux, de recruter deux sous-unités de l'exocyste, facteur multimérique d'arrimage, Sec8 et Exo70 (Folsch, Pypaert et al. 2003; Folsch 2005). L'exocyste est impliqué dans l'adressage basolatéral des récepteurs aux LDL (Grindstaff, Yeaman et al. 1998). De plus il a été montré que les sous-unités Sec6 et Sec8 sont localisées dans le tiers supérieur de la membrane basolatérale, sous les jonctions apicales, au seul niveau où des fusions de vésicules avec cette membrane sont observées dans les cellules MDCK (Kreitzer, Schmoranzer et al. 2003). L'assemblage du complexe exocyste à ces sites de fusion serait dépendant de la petite GTPase Ral1 qui interagit avec Sec5 et Exo84 (Moskalenko, Henry et al. 2002; Moskalenko, Tong et al. 2003). Les petites GTPases Rab8 et Cdc42 ont également été impliquées dans la régulation du trafic basolatéral, notamment en contrôlant la voie

Figure 22. LA CLATHRINE, SES ADAPTATEURS ET LEURS SIGNAUX PEPTIDIQUES CIBLES



LEGENDE.

Le manteau de clathrine est utilisé pour l'endocytose médiée par des récepteurs et les échanges entre Golgi et endosomes ou Golgi et lysosomes. Selon l'échange concerné il est recruté par différents adaptateurs de la classe des complexes AP par exemple ou des GGAs, etc. Chacun de ces complexes adaptateur se lie soit à des séquences peptidiques particulières (indiquées sous le nom de chaque adaptateur) contenues dans la queue cytosolique des protéines cargos (cas des motifs dileucines et tyrosine pour les complexes AP, GGA et Dab2) soit à des résidus ubiquitines ajoutés (pour les adaptateurs epsine, EPS15, HRS et STAM).

d'adressage dépendante d'AP-1B (Kroschewski, Hall et al. 1999; Musch, Cohen et al. 2001; Ang, Folsch et al. 2003), via la régulation du réseau d'actine, mais aussi possiblement en interagissant directement avec l'exocyste comme chez la levure pour Cdc42 (Zhang, Bi et al. 2001). Dans l'ensemble, le fait que l'exocyste soit important pour la sécrétion basolatérale comme cela a été observé, ne signifie cependant pas qu'il soit spécifique (ce qu'on verra plus loin dans la partie Résultats).

2.1.4.2 Des cargos étiquetés.

2.1.4.2.1 *Motifs d'adressage basolatéral.*

Les motifs basolatéraux sont essentiellement de courts signaux peptidiques contenus dans la queue cytosolique de la protéine et reconnus par des adaptateurs comme les complexes AP. il s'agit principalement de motifs dégénérés basés sur la tyrosine (YXXØ ou NPXY) ou de motifs de type dileucine ([DE]XXXL[LI] ou DXXLL) qui interagissent avec les sous-unités μ (Ohno, Stewart et al. 1995; Owen and Evans 1998) et β (Rapoport, Chen et al. 1998) des complexes AP, respectivement (Annexe 14 et Figure 22) (Bonifacino and Traub 2003).

La première étude qui a mis en évidence un tel motif (basé sur la tyrosine) est celle de Mostov et coll. en 1986, où il a été montré que le récepteur aux immunoglobulines A contenait un motif peptidique d'adressage à la membrane basolatérale, dont la délétion induisait une sécrétion apicale (Mostov, de Bruyn Kops et al. 1986). Ce même motif a ensuite été ajouté à la séquence de différentes protéines, qui se sont retrouvées adressées à la membrane apicale, montrant que ce motif est nécessaire et suffisant pour l'adressage basolatéral (Casanova, Apodaca et al. 1991). Cette propriété des motifs d'adressage basolatéraux a été observée aussi pour celui contenu dans le récepteur aux LDL (Hunziker, Harter et al. 1991; Matter, Hunziker et al. 1992). De plus, générer ce type de motif en mutant la séquence de protéines apicale comme HA ou p75, provoque leur adressage basolatéral et l'emporte sur tout signal supposé d'adressage apical (Brewer and Roth 1991; Le Bivic, Sambuy et al. 1991).

Le fait que les motifs basolatéraux l'emportent sur un éventuel adressage apical, et que la délétion de signaux basolatéraux induise un ré-adressage apical, suggèrent que la voie de sécrétion apicale fonctionne par défaut (Le Bivic, Sambuy et al. 1991). Cependant, la délétion de certains motifs d'adressage basolatéral dans des cellules polarisées ou non, entraîne une accumulation de cette protéine au niveau du Golgi (Musch, Xu et al. 1996; Gut, Kappeler et al. 1998). Ces observations indiquent que ces motifs sont en fait nécessaires

pour la sortie du Golgi, voire du RE (Nishimura and Balch 1997) et que sans signal particulier, des protéines auraient tendance à s'accumuler dans ces compartiments.

2.1.4.2.2 Motifs d'adressage apical.

Contrairement aux motifs dits « d'adressage basolatéral », la plupart des « signaux » d'adressage apical consistent non en des séquences peptidiques particulières mais plutôt en des modifications co- et post-traductionnelles par des lipides ou des glycans. La première modification co-traductionnelle identifiée comme signal d'adressage apical fut l'ajout de GlycosylPhosphatidylInositol (GPI) ou glypiation (Figure 8). Ainsi l'ajout d'un domaine de glypiation sur des protéines sécrétées basolatéralement (glycoprotéines virales), entraîne leur sécrétion à la membrane apicale (Brown, Crise et al. 1989; Lisanti, Caras et al. 1989). Inversement le remplacement de ce domaine de glypiation dans des protéines normalement ancrées au GPI par un motif d'adressage basolatéral, provoque leur adressage à la membrane basolatérale (Brown, Crise et al. 1989). De nombreuses protéines ancrées au GPI ont été identifiées et toutes sont sécrétées apicalement (Lisanti, Sargiacomo et al. 1988). L'idée qu'elles seraient préalablement adressées à la membrane basolatérale avant d'atteindre la membrane apicale par transcytose (Polishchuk, Di Pentima et al. 2004) a d'ailleurs été récemment battue en brèche (Hua, Sheff et al. 2006). D'autres modifications comme les O-glycosylations (Yeaman, Le Gall et al. 1997) et N-glycosylations (Scheiffele, Peranen et al. 1995) sont également impliquées dans l'adressage apical des protéines qui subissent ces modifications. La déglycosylation de ces protéines prévient leur adressage polarisé (Scheiffele, Peranen et al. 1995), et peut entraîner leur accumulation au niveau du Golgi (Gut, Kappeler et al. 1998), comme pour certaines protéines basolatérales dépourvues de leur motif d'adressage basolatéral.

Outre ces motifs ajoutés, il existerait d'autres motifs contenus dans certaines de ces protéines puisque la localisation apicale de certaines glycoprotéines sécrétées (Marzolo, Bull et al. 1997) transmembranaires endogènes ou exogènes (Bravo-Zehnder, Orio et al. 2000), n'est pas affectée quand on élimine les N-glycans (à moins que dans les cellules considérées la sécrétion apicale ne se fasse par défaut). D'autre part, des motifs peptidiques d'adressage à la membrane apicale contenus le plus souvent dans des domaines transmembranaires ont été plus récemment décrits (Altschuler, Hodson et al. 2003), notamment pour l'hémagglutinine HA (Scheiffele, Roth et al. 1997) et pour la mélaglycanine (Marzolo, Yuseff et al. 2003; Takeda, Yamazaki et al. 2003), et permettent l'adressage apical en association avec des radeaux lipidiques (cf. 2.1.4.3.2).

La protéine MAL/VIP17 a été proposée comme adaptateur pour le traffic associé aux DRMs (Cheong, Zacchetti et al. 1999), et d'autres lectines golgiennes comme VIP36 ont été

supposées impliquées dans le tri des protéines destinées à la membrane apicale (Fullekrug, Scheiffele et al. 1999). Cependant la première n'est détectée associée aux DRMs qu'à la membrane apicale (Jacob, Alfalah et al. 2000), tandis que la deuxième n'atteint pas le TGN, rendant peu probable un rôle de ces protéines dans l'adressage apical. La cavéoline 1 a également été incriminée pour la sortie du TGN des protéines ancrées au GPI (Sotgia, Razani et al. 2002) et du récepteur à l'angiotensine II (Wyse, Prior et al. 2003), mais est présente dans des DRMs aussi bien apicalement que basolatéralement, même si il a été suggéré que des homodimères de CAV1 seraient responsable de l'adressage apical, tandis que ce serait des hétérodimères CAV1/CAV2 pour l'adressage basolatéral (Scheiffele, Verkade et al. 1998). A ce jour il n'y a donc pas d'adaptateur protéique connu pour la sécrétion apicale.

2.1.4.3 Les lipides.

2.1.4.3.1 *Composition membranaire.*

Comme on l'a vu dans le premier chapitre, les membranes des différents compartiments présentent des compositions lipidiques différentes. Il en va de même entre les membranes apicale et basolatérale qui correspondent à deux compartiments distincts. La membrane apicale est ainsi enrichie en cholestérol et sphingolipides dans sa couche externe, ainsi qu'en glucosylcéramides, alors que sphingomyéline et galactosylcéramides sont répartis entre les deux domaines membranaires (Ait Slimane and Hoekstra 2002).

2.1.4.3.2 *Radeaux lipidiques.*

Les radeaux lipidiques appelés « lipid rafts », « Glycosphingolipid-enriched domains » (GSL-enriched domains), « Detergent Insoluble GSL-enriched domains » (DIGs), « GSL-enriched membranes/microdomains » (GEMs), « Triton-Insoluble Membranes » (TIMs), ou encore « Detergent-Resistant Membranes » (DRMs), sont des assemblages en phase « liquide-ordonnée » de 70 nm à 1 µm, enrichis en sphingolipides et cholestérol, présents à la membrane plasmique et dans certains compartiment endosomaux dans la plupart des cellules dont les fibroblastes, les cellules épithéliales et neuronales (Edidin 1997; Kobayashi and Hirabayashi 2000). La définition et le maintien de ces domaines implique le cytosquelette d'actine et des protéines transmembranaires qui limitent leur diffusion (Fujiwara, Ritchie et al. 2002). Le ratio cholestérol vs sphingolipides est essentiel, et la déplétion des sphingolipides (Hanada, Nishijima et al. 1995) ou du cholestérol (Keller and Simons 1998; Pike and Miller 1998) induit des défauts de trafic membrinaire. En revanche, la nature de la tête polaire des sphingolipides influe peu sur la stabilité et la fonctionnalité de

ces domaines (Schroeder, London et al. 1994; Hidari, Ichikawa et al. 1996; Ostermeyer, Beckrich et al. 1999; Kobayashi and Hirabayashi 2000).

Ces domaines seraient mis en place dès le RE sous une forme immature où ils contribueraient déjà au tri des protéines ancrées au GPI (GlycosylPhosphatidylInositol) (Muniz and Riezman 2000; Muniz, Morsomme et al. 2001). Celles-ci sont en effet systématiquement associées à des DRMs (Brown and Rose 1992; Hannan, Lisanti et al. 1993; Schroeder, London et al. 1994; Mirre, Monlauzeur et al. 1996; Alfallah, Jacob et al. 1999; Muniz and Riezman 2000; Fivaz, Vilbois et al. 2002). Considérant que d'autres protéines apicales comme la mégaline, HA, des sous-unités de la V-ATPase (Dermine, Duclos et al. 2001) sont également associées aux radeaux lipidiques, un rôle de ces microdomaines dans l'adressage apical des protéines est possible, ce qui a été suggéré pour les cellules MDCK dès 1988 (van Meer and Simons 1988).

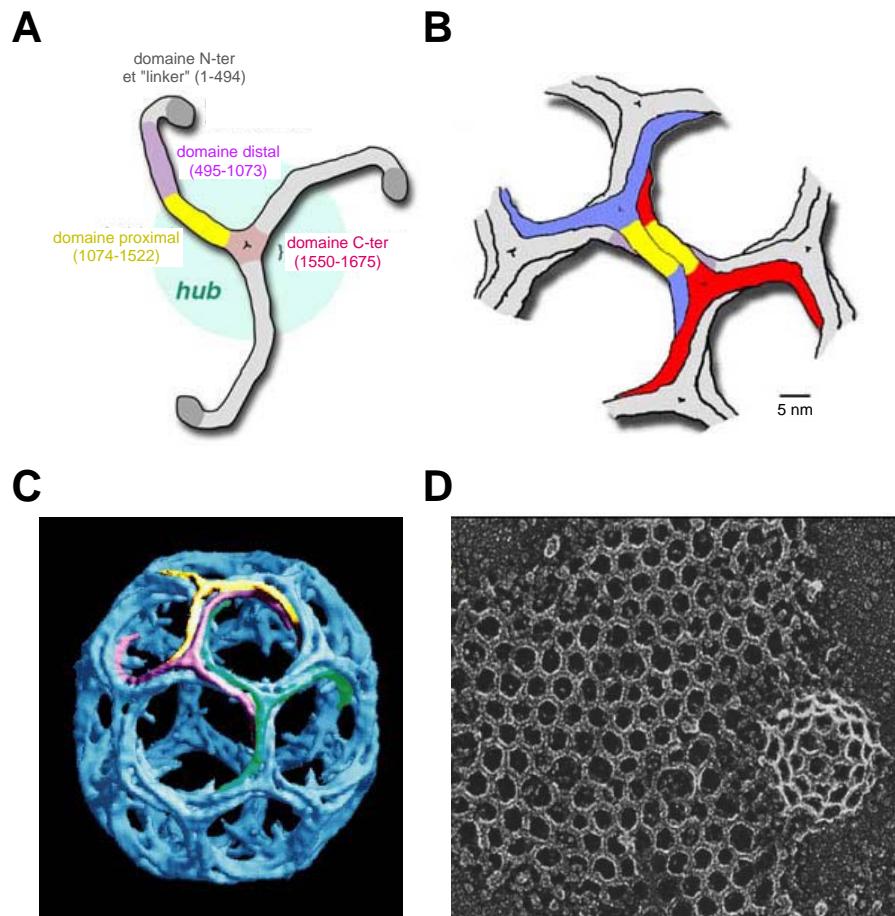
Cependant l'association à ces radeaux lipidiques (ou « rafts ») est insuffisante pour assurer une sécrétion apicale (Sarnataro, Grimaldi et al. 2005), et ne paraît pas non plus nécessaire comme illustré par la protéine HA mutée (Tall, Alonso et al. 2003). Malgré tout, dans une autre étude et avec une définition biophysique (basée sur des observations par FRAP, « Fluorescence Recovery After Photobleaching ») plutôt que biochimique (par le critère de résistance à 4°C aux détergents, qui ne discrimine d'ailleurs pas les radeaux lipidiques des cavéoles) cette même protéine HA mutée a été trouvée associée avec des radeaux lipidiques de façon dépendante du cholestérol (Shvartsman, Kotler et al. 2003). Inversement cette même étude a montré que des mutations de HA qui empêchent sa localisation apicale, préviennent également son association avec les radeaux lipidiques. L'hypothèse d'un rôle au moins partiel de ces microdomaines dans l'adressage apical est donc encore valable.

Il semble par ailleurs que les N-glycans et O-glycans collaborent à l'adressage apical par les « rafts » (Alfallah, Jacob et al. 1999; Benting, Rietveld et al. 1999), en favorisant l'oligomérisation des protéines associées à ces domaines (Paladino, Sarnataro et al. 2004; Schuck and Simons 2004).

2.2 Les compartiments de la voie endocytotique.

J'ai choisi ici de ne pas m'étendre sur la phagocytose qui nécessiterait d'introduire le cytosquelette cellulaire et sa dynamique à la membrane plasmique. D'autre part, je n'insisterai pas sur les diverses modalités d'association entre adaptateurs, facteurs d'arrimages et clathrine à la membrane plasmique, bien qu'il existe effectivement différents

Figure 23. LA CAGE DE CLATHRINE.



LEGENDE.

A : Structure d'un triskelion de clathrine. Les clathrines s'associent entre elles au niveau de leurs parties C-terminales.

B : Maille de la cage de clathrine, association entre les triskelions.

C : Représentation 3D d'une cage de clathrine minimale pouvant couvrir une structure vésiculaire.

D : Clathrine polymérisée sur la membrane interne d'une cellule de carcinome humain, visualisée en microscopie électronique à balayage.

types de vésicules d'endocytose. J'ai préféré aborder la diversité des compartiments de type endosomal (E) / lysosomal (L) / corps multivésiculaire (CMV) que l'on retrouve impliqués dans la sécrétion (cf. 2.4 et 2.5)

2.2.1 Les vésicules d'endocytose.

2.2.1.1 Formation des vésicules recouvertes de clathrines.

2.2.1.1.1 Généralités.

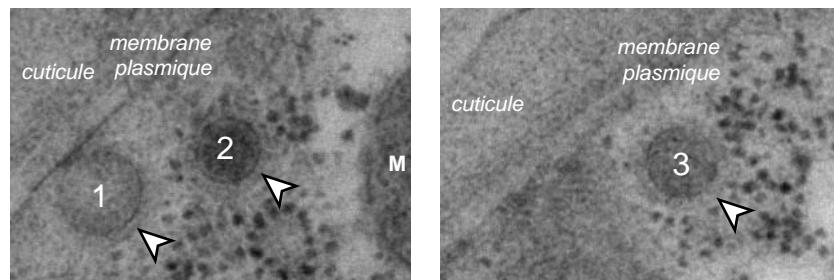
L'endocytose se décline selon différents modes évoqués plus haut. Nous nous intéressons ici à celui qui est le mieux caractérisé et qui implique des mécanismes de reconnaissance et de recyclage de récepteurs (à la membrane post-synaptique par exemple). Les vésicules d'endocytose, à l'instar des vésicules COPI et COPII, sont recouvertes d'un manteau protéique qui permet de faciliter la courbure membranaire nécessaire au bourgeonnement et à la fission de la vésicule, et qui s'associe avec des adaptateurs spécifiques. Les vésicules d'endocytose sont contenues dans des cages polyédriques vides dont les arrêtes sont constituées par des bras de clathrine (Crowther and Pearse 1981). La clathrine y est organisée en trimères qui contribuent chacun au sommet commun de trois polyèdres voisins et à leurs arrêtes communes (Crowther and Pearse 1981) (Figure 23). La taille de ces vésicules cagées est de l'ordre de 50 à 100 nm. On peut les observer à proximité de la membrane plasmique, mais le manteau de clathrine est rapidement dépolymérisé suivant leur formation, permettant la fusion subséquente de ces vésicules avec leurs compartiments cibles. Les complexes adaptateurs classiques associés à la clathrine sont les complexes AP-1, -2, -3 (AP pour « Adpator Protein »). AP-4 ne possède pas de domaine de liaison à la clathrine (Figure 22).

2.2.1.1.2 L'initiation de la vésiculogenèse.

Le schéma classique veut que la fixation d'un ligand sur son récepteur (par exemple le morphogène Hedgehog sur son récepteur Patched, ou le récepteur à la transferrine, etc.) souvent oligomérisé dans des microdomaines membranaires qui forment des plateformes de signalisation, recruterait des protéines à domaine BAR (« Bin/Amphiphysin/Rvs »), capables d'induire une courbure membranaire (Antonny 2006), comme l'amphiphysine (Peter, Kent et al. 2004) ou l'endophiline (Farsad, Ringstad et al. 2001). Cela s'accompagnerait du recrutement du complexe adaptateur AP-2 pour la membrane plasmique (« Adaptator Complex_2 »), qui fixe les récepteurs (au niveau de domaines protéiques FDNPVY, LL, ou

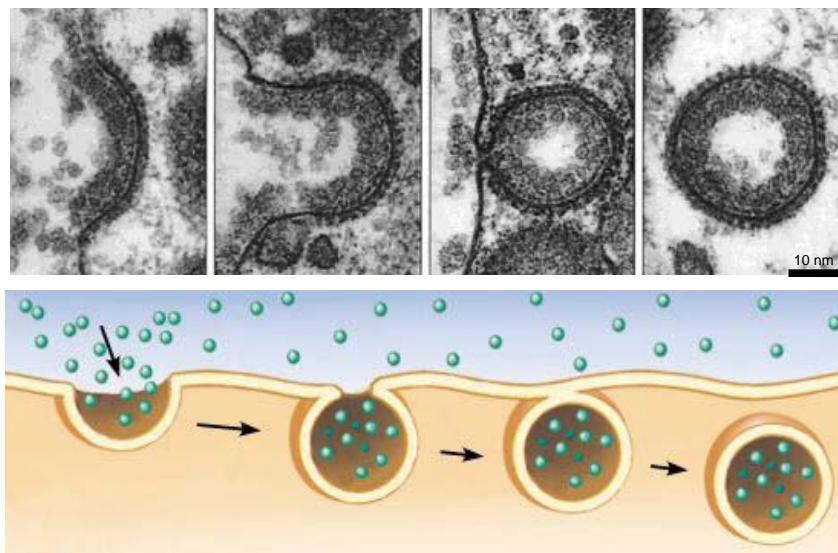
Figure 24. VESICULES CAGEES D'ENDOCYTOSE

A

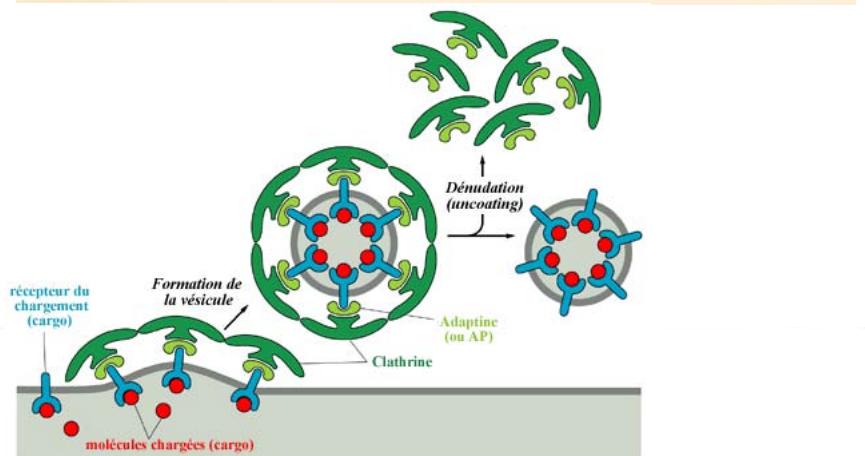


Vésicules cagées (flèches) d'endocytose (1, 2, 3) dans le syncytium hyp7 de *C. elegans*

B



C



LEGENDE.

A : Images en MET après HPF, de vésicules cagées d'endocytose. La vésicule 1 est en cours de fission, les vésicules 2 et 3 vont bientôt perdre leur manteau (têtes de flèches). M : mitochondrie.

B : Images de MET récapitulant la formation d'une vésicule cagée d'endocytose et schéma d'interprétation.

C : Schéma représentant la formation et la dissociation d'un manteau de vésicule cagée. Le manteau est formé par des complexes recrutés par des adaptateurs comme l'adaptine ou les complexes AP, qui recrutent également les récepteurs et leurs cargos.

$\text{Ypp}\emptyset$) d'une part et la clathrine d'autre part (Kirchhausen 2000). A cette étape, on parle de « puits recouverts » de clathrine (ou CCP, « Clathrin Coated Pits »)(Figure 24). Cependant, AP-2 semble insuffisant in-vitro pour assurer le recrutement de la clathrine, et n'est pas requis pour tous les processus d'endocytose. En fait, des complexes adaptateurs alternatifs comme AP180/CALM, l'epsine, HIP1/Hip1R, et Disabled-2, capables de fixer le PI(4,5)P₂ (« PhosphatidylInositol 4,5-bisPhosphate », lipide enrichi à la membrane plasmique au niveau des sites d'endocytose et de phagocytose) et la clathrine (McMahon and Mills 2004), seraient localement associés à des oligomères de clathrine, formant sur la face cytosolique de la membrane plasmique, des sites d'initiation de l'endocytose. Ce serait alors la fixation d'un ligand/cargo au niveau de ces structures et en association avec AP-2, qui stabiliseraient les puits recouverts et permettrait véritablement la vésiculogenèse (Keyel and Traub 2004).

2.2.1.1.3 Un réseau d'interactions protéiques complexe.

Le réseau de protéines interagissant avec AP-2 et la clathrine est très complexe comparé à ce qui est connu pour les manteaux COPI et COPII. Il implique notamment les protéines suivantes : synaptotagmine, N-WASP (« Neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome Protein »), syndapine, synaptopjanine, endophiline, dynamine, intersectine, epsine, EPS15, AP180, amphiphysine, β -arrestine (Kirchhausen 2000). La complexité de ce réseau s'explique en partie par le fait que les manteaux à clathrine sont aussi impliqués dans la formation de vésicules en partance du TGN (en combinaison avec AP-1 au lieu d'AP-2) ou d'endosomes (cf. plus loin)(Hirst and Robinson 1998). Les manteaux à clathrine participent ainsi à différents types de vésiculogenèses impliquant différentes combinaisons d'adaptateurs, de régulateurs et différentes tailles et compositions de vésicules ; ce qui complique l'élucidation des étapes de formation des vésicules à clathrine.

2.2.1.1.4 La fission des vésicules à clathrine.

L'étape critique de la vésiculogenèse est la fission de la vésicule, attachée à la membrane plasmique par un cou lipidique. Cette étape fait intervenir des processus mécaniques et biochimiques.

Le premier de ces mécanismes implique la dynamine recrutée par l'amphiphysine via son domaine SH3 (Wigge, Vallis et al. 1997; Miele, Watson et al. 2004). La dynamine est une GTPase qui, liée au GTP (par l'action d'une GEF) polymérise en spirale et forme un col autour du cou de la vésicule. L'hydrolyse séquentielle des GTP par les différents monomères du col provoquerait une réduction du diamètre de la spirale au bénéfice de son allongement, qui étranglerait, étirerait et fragiliserait le cou de la vésicule, modèle dit du « boa constrictor » (Kirchhausen 1999) ou du « col bleu » (Yang and Cerione 1999). Alternativement la dynamine recruterait d'autres facteurs protéiques directement impliqués dans la fission,

modèle du « crotale » (Kirchhausen 1999) ou du « col blanc » (Yang and Cerione 1999). Les données les plus récentes penchent en faveur du premier modèle (Danino, Moon et al. 2004), même si l'activité de la dynamine est fortement modulée par des activateurs comme SNX9 (« Sorting NeXin 9 » (Soulet, Yarar et al. 2005)), l'amphiphysine (Yoshida, Kinuta et al. 2004; Yoshida and Takei 2005) ou la cortactin et le réseau d'actine (Merrifield, Perrais et al. 2005; Chen, Wang et al. 2006), et des inhibiteurs parmi lesquels l'endophiline (Farsad, Ringstad et al. 2001; Hill, van Der Kaay et al. 2001) et la tyrosine-phosphatase PTP-NP/Phogrine/IAR/IA-2 (Jiang, Avraham et al. 2006).

D'autres mécanismes reposent sur des conversions des lipides membranaires. L'endophiline agirait comme une acyltransférase pour produire de l'acide lysophosphatidique qui accentuerait la courbure négative du cou, favorisant ainsi l'étrécissement du cou lipidique, donc la fission (Barr and Shorter 2000; Zimmerberg 2000). La phospholipase D contribuerait aussi à cette courbure négative en provoquant une augmentation de la concentration locale en DAG (« DiAcylGlycérol »). Quant-à la synaptojanine, en convertissant le PI(4,5)P₂ en PI4P, elle modifierait l'affinité pour les lipides membranaires et le recrutement des adaptateurs AP-2, de la β-arrestine et de la dynamine .

2.2.1.1.5 *Détachement du manteau de clathrine.*

Une fois la vésicule détachée de la membrane, le manteau de clathrine n'est plus requis pour maintenir l'intégrité de celle-là, et constituerait un obstacle à sa fusion avec les compartiments en aval dans la voie d'endocytose. Il se dissocie en fait très rapidement (Keyel and Traub 2004).

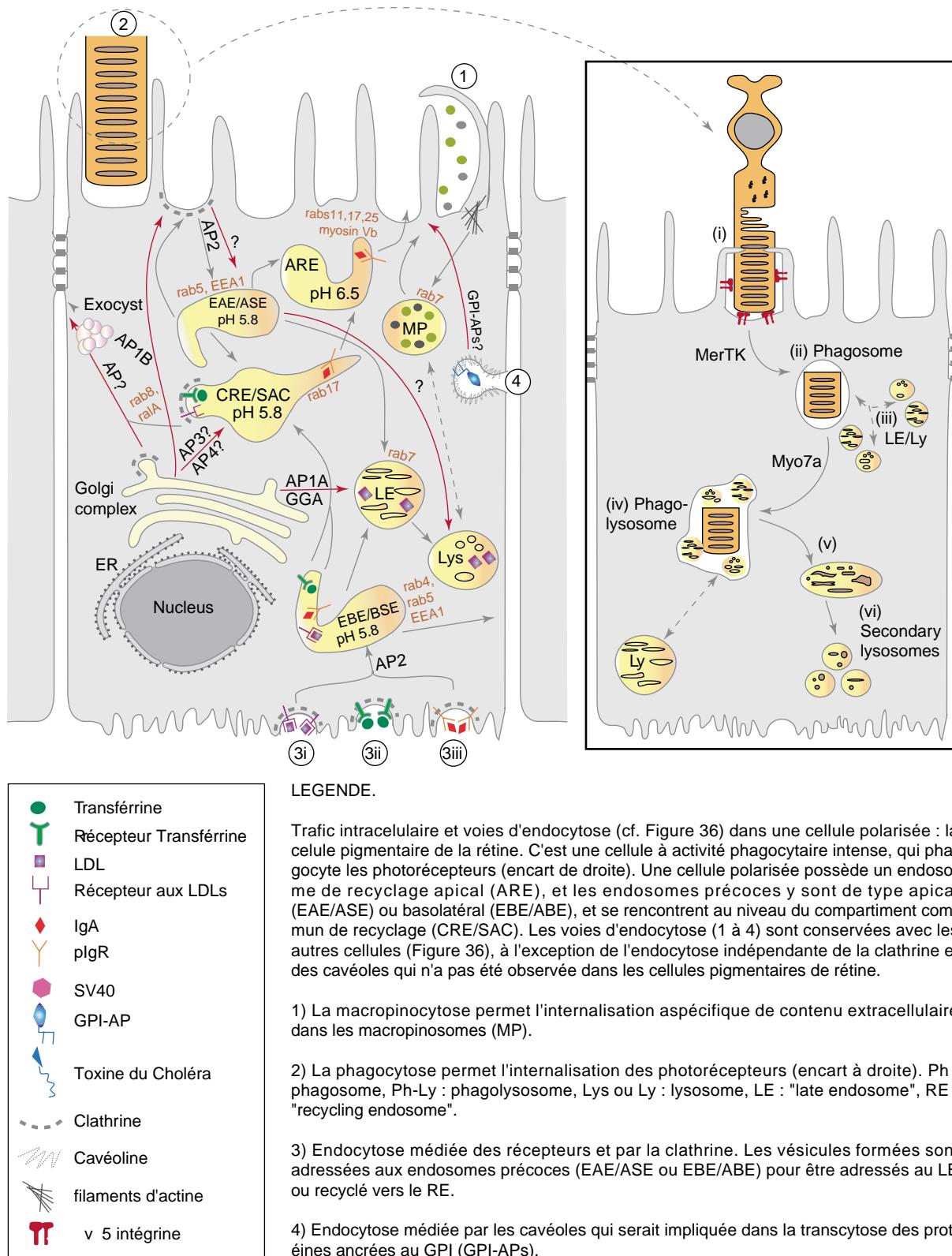
2.2.1.2 Adressage des vésicules cagées.

Les vésicules libérées de leur manteau exposent des protéines de reconnaissance et d'adressage, qui ne leur permettent de fusionner qu'avec les compartiments possédant les protéines réceptrices appropriées.

Parmi celles-ci, on retrouve les protéines SNARE (comme VAMP1 et 2), des adaptateurs et facteurs d'arrimage (AP-2, EEA1 : « Early Endosomes Associated protein 1 », la Rabadaptine 5) et les petites GTPases (comme Rab5) décrites plus haut en 1.4. Les vésicules sont également capables de fusionner entre elles pour initier la formation de nouveaux endosomes précoces (cf. 2.2.2).

2.2.2 Diversité des endosomes.

Figure 25. TRAFIC ENDOLYSOSOMAL DANS UNE CELLULE POLARISEE : EXEMPLE DE LA CELLULE PIGMENTEE DE LA RETINE.



2.2.2.1 Evolution des endosomes.

A l'image de la maturation du Golgi, il existe un paradigme de la maturation des compartiments endolysosomaux. Celui-là veut que de la membrane plasmique à la voie de dégradation, une succession de compartiments endosomaux aux compositions différentes en termes de lipides, de facteurs d'adressage, d'arrimage, et de fusion, permet le transport de cargo captés initialement par endocytose. Cette idée est à l'origine des appellations comme endosome précoce et tardif, lysosome primaire et secondaire. Assez rapidement il a aussi été introduit la notion d'endosome de recyclage pour tenir compte des cas de recyclage rapide des récepteurs par exemple. Je présenterai donc les différents compartiments de l'endocytose en adoptant ce schéma qui conserve une certaine justesse, même si tout n'est pas si linéaire, comme on le verra plus loin.

2.2.2.2 Endosome précoce (EP).

Les endosomes précoces (EP, ou EE pour « Early endosomes ») sont des compartiments de petite taille, de l'ordre de quelques centaines de nanomètres de diamètre, situés à proximité de la membrane plasmique et appelés aussi endosomes de tri (« sorting endosomes », mais je n'utiliserai pas cette appellation pour éviter les confusions). Ils sont caractérisés par différents marqueurs moléculaires comme la dynamine, Rab5 et sa GEF (Rabex5), Rab4, AP-2, EEA1, la Rabadaptine 5, les syntaxines 7, 8 13, les VAMP1, 2, 3, 8 (« Vesicle Associated Membrane Proteins »), des protéines de la classe des VPS de classe E (« Vacuolar Protein Sorting ») et des complexes escortines, comme Hrs/VPS-27. De plus, ils sont enrichis en PI₃P, que les protéines à domaine FYVE comme EEA1 peuvent lier. Ils contiennent également des Rab, SNAREs, adaptateurs, et autres protéines qui ne font que transiter par ce compartiment ou qui sont présentes en moindre quantités et que l'on trouvera plus abondamment dans d'autres compartiments endosomaux. Les endosomes précoces sont formés par fusion homotypique des vésicules d'endocytose et fusion de ces vésicules avec les endosomes précoces déjà formés. Une autre caractéristique importante des EPs est leur pH acide (de l'ordre de 5,8 à 6), qui permet la dissociation du ligand et de son récepteur (en cas d'endocytose médiée par des récepteurs) (Yamashiro and Maxfield 1984). Suivant le type de récepteur et le type de cellule, celui-là peut être soit dégradé après adressage à la voie de dégradation endolysosomale, soit être recyclé en étant redirigé vers le TGN, ou vers des endosomes de recyclage (ERs, ou REs : « Recycling Endosomes ») (Yamashiro and Maxfield 1984). Dans les cellules polarisées comme les cellules épithéliales, l'existence de deux pôles : apical et basolatéral, implique celle de deux types d'EPs : EPAs (apicaux, ou EAE pour « Early Apical Endosomes ») et EPBs (basolatéraux, ou EBE pour « Early Basolateral Endosomes ») (Figure 25). Ceux-ci sont clairement indépendants

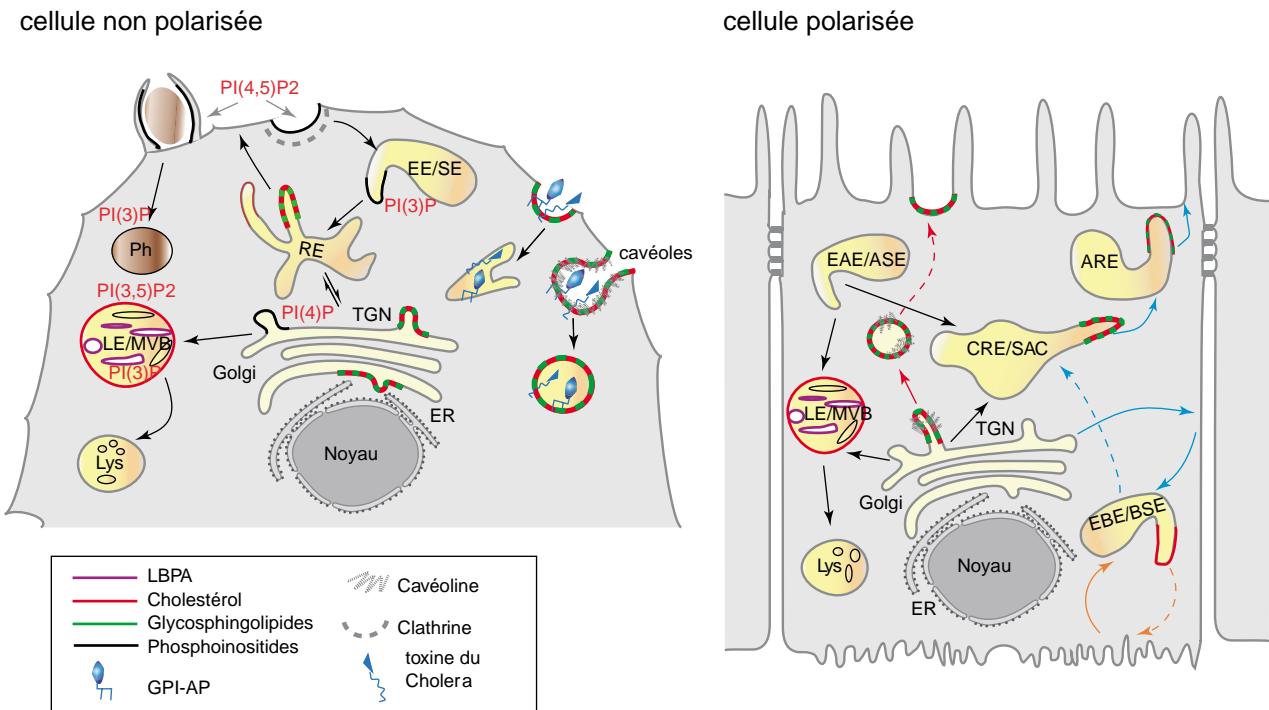
puisque aucun fluide, ni aucun cargo (récepteur et ligand) internalisé par l'un, n'est détectable dans l'autre (Huber, Fialka et al. 2000). L'actine semble être impliquée dans cette nette séparation puisque sous l'action de la latrunculine B, le récepteur à la transferrine (TfR) normalement purement basolatéral, se retrouve également à la membrane apicale dans les cellules CaCo-2 (lignée 2 de Carcinome du Colon) (Durrbach, Raposo et al. 2000) et MDCK (« Madin-Darby Canine Kidney ») (Sheff, Kroschewski et al. 2002).

2.2.2.3 Endosome de recyclage (ER).

Les ERs (ou ARE pour « Apical Recycling Endosomes » dans les cellules polarisées (Figure 25) (Apodaca, Katz et al. 1994; Leung, Ruiz et al. 2000)) sont des compartiments de pH= 6,4 à 6,5 impliqués dans le recyclage de protéines membranaires comme les pompes, canaux, transporteurs et récepteurs, pour des processus généralement rapides en réponse à un stimulus (ionique : calcium, dépolarisation membranaire, ou hormonal). Ils sont enrichis en Rab3D (Larkin, Woo et al. 2000), Rab11, Rab17 (Hunziker and Peters 1998; Zacchi, Stenmark et al. 1998), et radeaux lipidiques riches en cholestérol, sphingomyélines, cavéoline-1 et flotiline-1 (Gagescu, Demaurex et al. 2000). Leur pH est relativement élevé pour un compartiment endosomal car ces organites seraient dépourvus de V-ATPase fonctionnelle (Gagescu, Demaurex et al. 2000). Ces compartiments ont été mis en évidence pour la première fois dans le recyclage de la transferrine (Yamashiro and Maxfield 1984). C'est ainsi le cas du recyclage postsynaptique des récepteurs glutamatergiques AMPA (« AMPA ») dans l'hypothalamus pour le phénomène de (LTP pour « Long Term Potentiation »). Ce fut observé en exprimant des mutants dominants négatifs de Rme-1 et Rab11a qui sont spécifiques des REs, et leur effet sur la LTP (Park, Penick et al. 2004). On peut également citer le cas de p75^{NTR}, cofacteur du NGF (« Neuronal Growth Factor ») qui est également recyclé à la membrane plasmique via les REs dans les cellules PC12 (« PC12 ») (Saxena, Howe et al. 2005). Ce recyclage par les REs est également important pour les apolipoprotéines ApoE des HDL (« High Density Lipoprotein ») et LDL (« Low Density Lipoprotein ») (Heeren, Beisiegel et al. 2006), et pour différents récepteurs hormonaux (Gaborik and Hunyady 2004). L'ARE dans les cellules polarisées est également impliqué dans la transcytose qui permet le passage de protéines de la membrane basolatérale à la membrane apicale (Hunziker and Peters 1998; Zacchi, Stenmark et al. 1998; Larkin, Woo et al. 2000).

D'autres compartiments de recyclage/sécrétion existent et ne sont pas considérés comme des ERs, comme les petites GSVs (« GLUT-4 Storage Vesicles ») impliquées dans le recyclage régulé par l'insuline des transporteurs de glucose GLUT-4 dans les adipocytes (Ishiki and Klip 2005), ou à l'inverse les énormes « enlargeosomes » qui permettent

Figure 26. COMPOSITION LIPIDIQUE DANS LES COMPARTIMENTS ENDOLYSOSOMAUX .



LEGENDE.

Les lipides ne sont pas répartis de façon homogène entre les différents compartiments endolysosomaux. Les phosphoinositides comme le PI(3)P sont ainsi enrichis des endosomes précoces (EE/SE, EAE/ASE, EBE/ABE) aux endosomes tardifs (LE, MVB) y compris dans les phagosomes (Ph), tandis que le PI(4,5)P₂ est enrichi à la membrane plasmique, et que le PI(4)P est enrichi au niveau du *trans*-Golgi (TGN). Cholestérol et glycosphingolipides forment des microdomaines au niveau du TGN, des endosomes de recyclage (RE, ARE et CRE/SAC) et de la membrane plasmique (par exemple au niveau des cavéoles). Les endosomes tardifs multivésiculaires (LE/MVB) sont enrichis spécifiquement en PI(3,5)P₂ et surtout en LBPA ("Lysobisphosphatidic acid") impliqués dans la formation des vésicules intraluminales. GPI-AP : protéines ancrées au GPI.

d'augmenter la surface de membrane plasmique de manière régulée par le calcium (Borgonovo, Cocucci et al. 2002; Cocucci, Racchetti et al. 2004).

2.2.2.4 Endosome Commun de Recyclage (ECR, ou CRE pour « Common Recycling Endosome », ou SAC « Sorting Apical Compartment »).

Ce type de compartiment est une spécificité des cellules dites polarisées (comme les cellules épithéliales) (Figure 25). Un premier compartiment correspondant avait été appelé endosome tardif apical dans l'épithélium intestinal de rat (Fujita, Reinhart et al. 1990) puis isolé sous l'appellation RRC (« Receptor Recycling Compartment ») à partir de fractions de cellules de foie de rat (Verges, Havel et al. 1999). La dénomination SAC a été donnée dans les hépatocytes (Ihrke, Martin et al. 1998; Hoekstra, Tyteca et al. 2004), tandis que l'appellation CRE ou CE (« Common Endosome ») vient des cellules épithéliales rénales MDCK (Leung, Ruiz et al. 2000; Mostov, Verges et al. 2000). C'est un réseau tubulo-vésiculaire s'étendant sur le pourtour apical de la cellule dans les cellules 3T3, PC12 (Tooze and Hollinshead 1991), MDCK (Futter, Gibson et al. 1998), Caco-2 (Durrbach, Raposo et al. 2000), les hépatocytes (Rahner, Stieger et al. 2000), et les entérocytes (Hansen, Pedersen et al. 2003). Dans les cellules MDCK en MET, le CRE est formé de tubules d'un diamètre moyen de 60 nm et de vésicules aplatis plus apicales de 100 à 150 nm (Futter, Gibson et al. 1998; Gibson, Futter et al. 1998). Cet organite serait le compartiment principal de tri avec le TGN dans ces cellules. Il connecte les voies d'endocytose et de recyclage aux membranes basolatérale et apicale, avec la voie biosynthétique. Il présente un appauvrissement en EEA1 comme les ERs par rapport aux EPs, mais un pH acide de 5,8 qui le distingue des ERs. Il est enrichi en Rabs 4, 17 et 25, et AP-1B (Hoekstra, Tyteca et al. 2004).

2.2.2.5 Endosome tardif.

Les ETs apparaissent classiquement en ME comme des compartiments multivésiculaires (CMVs, cf.2.3.4). Ils sont enrichis en différents lipides comme le LBPA, le PI3P, le cholestérol et les sphingomyélines (Figure 26). Le jeu de ces lipides et des protéines comme HRS, les ESCRT, VPS24 et Alix (cf. 2.3.4) permet la formation de leurs vésicules intraluminales.

Les ETs sont typiquement enrichis en Rab7 (Meresse, Gorvel et al. 1995) et ORP1L (« QSBP « OxySterol Binding Protein » Related Protein 1L ») (Johansson, Lehto et al. 2005) nécessaire à leur transport associé aux microtubules (Jordens, Fernandez-Borja et al. 2001; Lebrand, Corti et al. 2002), et en syntaxines 7, 8 (Prekeris, Yang et al. 1999; Nakamura,

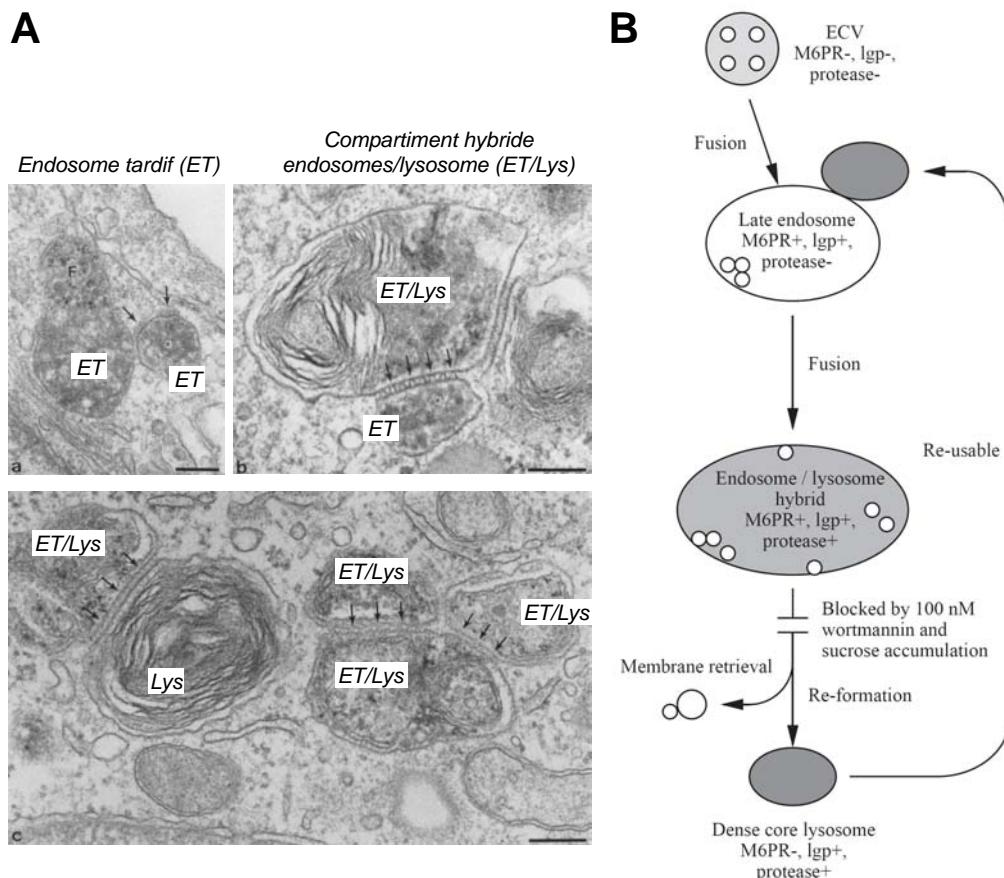
Yamamoto et al. 2000) et 11 (Valdez, Cabaniols et al. 1999), VAMP7 (Advani, Yang et al. 1999) et VAMP8 (Antonin, Holroyd et al. 2000; Antonin, Holroyd et al. 2000; Wade, Bryant et al. 2001) qui sont nécessaires à leur fusion homotypique.

Initialement baptisés vésicules CURL (« Compartiment of Uncoupling Receptor and Ligand ») (Geuze, Slot et al. 1983), les endosomes tardifs (ETs) se situent entre les EPs et les lysosomes et constituent des pré-lysosomes (Tjelle, Brech et al. 1996). Ils présentent un pH bas de l'ordre de 5 à 6 et réalisent des fusions et fissions avec les lysosomes par l'intermédiaire de compartiments intermédiaires (Bright, Reaves et al. 1997; Mullock, Bright et al. 1998; Luzio, Mullock et al. 2001; Luzio, Pryor et al. 2005). La fusion ferait intervenir la mucolipine (Treusch, Knuth et al. 2004) et requiert l'acidification préalable des ETs par la V-ATPase (van Deurs, Holm et al. 1993; Sun-Wada, Wada et al. 2003; Castillo-Avila, Abal et al. 2005; Hurtado-Lorenzo, Skinner et al. 2006) tandis que la fission fait intervenir l'AAA-ATPase VPS4 (Fujita, Yamanaka et al. 2003).

2.2.3 Les lysosomes

Les lysosomes sont les compartiments terminaux de la voie de dégradation endocytotique. Ils présentent une structure multilamellaire parfois très dense aux électrons. Lors de la formation d'intermédiaires ET-lysosome, on peut observer des corps mixtes multilamellaires et multivésiculaires (Figure 27). Le pH des lysosomes est acide, de l'ordre de 5 à 5,5. Les lysosomes sont caractérisés par quelques marqueurs moléculaires comme LAMP-1 (« Lysosome Associated Membrane Protein 1 »), LAMP-2, CD63, les protéines chaperonnes de la famille de Hsc70 (Agarraberes and Dice 2001) et différentes hydrolases acides. Les LAMPs et CD63 contiennent des motifs peptidiques de type tyrosine YXXØ reconnus par les complexes AP qui les adressent aux lysosomes. Elles sont également protégées de la dégradation par l'ajout de groupements glycosylés sur des asparagines (Kundra and Kornfeld 1999). Les hydrolases acides en revanche sont mannosidées et adressées aux lysosomes par la voie des récepteurs au mannose-6-phosphate (Ghosh, Dahms et al. 2003) grâce aux adaptateurs GGAs (« Golgi localized Gamma-ear-containing Arf binding proteins ») (Puertollano, Aguilar et al. 2001; Zhu, Doray et al. 2001). Les lysosomes sont transportés le long des microtubules grâce à une machinerie impliquant la GTPase Arl8 (« Arl-like 8 ») (Hofmann and Munro 2006).

Figure 27. ENDOSOMES TARDIFS ET LYSOSOMES.



LEGENDE.

A : Photographies en microscopie électronique d'endosomes tardifs multivésiculaires (ET) et de compartiments hybrides (ET/Lys) formés par fusion des lysosomes (Lys) et des endosomes tardifs. Des structures d'adhésion sont visibles avant fusion à l'interface entre deux compartiments (flèches noires, barres 0.2 µm).

B : Modèle de biogénèse et maturation des compartiments hybrides ET/Lys. Les endosomes tardifs (LE) sont alimentés par des endosomes précoces contenant des vésicules (ECV), puis fusionnent avec des lysosomes pour former un compartiment hybride. Le contenu est dégradé par des protéases lysosomales et compacté, tandis que des membranes sont prélevées, pour finalement former un lysosome réutilisable alors dans la fusion avec un nouvel endosome tardif.

2.2.4 Modes alternatifs d'internalisation de composés extracellulaires (Annexe 15 et Figure 25).

2.2.4.1 Phagocytose.

Ce mode d'endocytose ne fait pas intervenir la voie endosomale classique. Une fois la cible entourée de cytoplasme par fusion des extensions cytoplasmiques (cf.2.1.3), l'ensemble est tracté dans la cellule par le cytosquelette et forme un phagosome. Celui-ci est progressivement acidifié comme chez la paramécie (Allen, Ma et al. 1993) avant de fusionner avec des lysosomes pour former des phagolysosomes (Ph-Lys) dont le contenu sera dégradé sous l'action des hydrolases lysosomales (Fok and Allen 1990).

2.2.4.2 Macropinocytose.

Ce processus implique également la formation de protrusions cytoplasmiques, généralement stimulée par des facteurs de croissance, mais qui au lieu de cibler des substrats de grosse taille, vont simplement engloutir du milieu extracellulaire, pour former des macropinosomes (MPs). Ceux-ci seront recyclés à la membrane ou fusionneront avec des lysosomes pour être dégradés.

2.2.4.3 Endocytose indépendante de la clathrine et des cavéolines.

Ce mécanisme est encore mal décrit, mais impliquerait l'endocytose de radeaux lipidiques de 40 à 50 nm contenant des protéines ancrées au GPI, qui seraient ensuite adressées à des compartiments endocytotiques précoces enrichis en protéines à GPI (CEPGs), avant d'atteindre le TGN ou les endosomes de recyclage (ERs).

2.2.4.4 Endocytose par les cavéoles ?.

Les cavéoles sont des invaginations membranaires de petite taille formées par l'oligomérisation de cavéolines (1, 2, ou 3 pour le muscle (Hagiwara, Sasaoka et al. 2000)) (Rothberg, Heuser et al. 1992) ménageant des puits relativement stables (Stan 2005) principalement observés à la surface de la membrane basolatérale des cellules polarisées. L'internalisation des cavéoles est un évènement bien connu de l'infection par SV40 (« Simian Virus 40 » (Pelkmans, Puntener et al. 2002)). En revanche, l'existence de ce type d'endocytose en conditions non pathologiques est très controversée. Il serait impliqué dans la transcytose des protéines ancrées au GPI, lors de leur parcours supposé du TGN à la

membrane basolatérale puis à la membrane apicale (Mayor, Rothberg et al. 1994; Skretting, Torgersen et al. 1999; Sabharanjak, Sharma et al. 2002). Ce processus impliquerait des cavéosomes et des CEPGs. Les données les plus récentes semblent invalider complètement cette thèse, puisque les protéines ancrées au GPI seraient en réalité directement adressées à la membrane apicale sans que la transcytose intervienne (Hua, Sheff et al. 2006). La fonction des cavéoles est encore peu claire mais des mutations des cavéolines sont responsables de maladies myodégénératives et d'hyper-proliférations des cellules alvéolaires et vasculaires (Drab, Verkade et al. 2001; Razani, Engelman et al. 2001).

2.3 Les compartiments terminaux de la sécrétion protéique et les modalités d'exocytose.

Je ne détaillerai pas les processus les mieux connus comme ceux de la sécrétion des petites vésicules synaptiques, pour insister sur des types de sécrétion moins conventionnels impliquant des processus plus lents et/ou des compartiments de plus gros volume, dont le mode de sécrétion a davantage de chance de se rapprocher du mode de sécrétion auquel j'ai été amené à m'intéresser au cours de ma thèse (cf. Résultats Article 2)..

2.3.1 Les vésicules de sécrétion : fusion régulée complète et « kiss-and-run ».

On classe les processus de sécrétion en deux types définis comme sécrétion constitutive et sécrétion régulée. Le premier mode de sécrétion aurait pour rôle principal l'entretien des membranes plasmiques, le recyclage de leurs constituants : lipides, récepteurs, glycoprotéines, canaux, pompes, etc. Le second mode de sécrétion, dont il semble maintenant que pratiquement toutes les cellules soient capables naturellement ou lorsqu'elles sont lésées (Reddy, Caler et al. 2001; McNeil and Steinhardt 2003), implique une augmentation du calcium intracellulaire, déclenchant la fusion de vésicules (neurones) ou de granules (cellules endocrines et exocrines) avec la membrane plasmique, libérant alors leur contenu (neurotransmetteurs, neurohormones, hormones, paracrines, enzymes, surfactant, etc.) dans l'espace extracellulaire.

Dans ce dernier processus, deux modes d'exocytose ont été mis en évidence : l'un menant à la fusion complète des vésicules avec la membrane plasmique, l'autre appelé

« kiss-and-run » (Fesce, Grohovaz et al. 1994; Artalejo, Elhamdani et al. 1998; Valtorta, Meldolesi et al. 2001; Aravanis, Pyle et al. 2003; Tsuboi and Rutter 2003; Wightman and Haynes 2004) et impliquant la formation transitoire d'un pore de 1 à 5 nm de diamètre (Lollike, Borregaard et al. 1995; Artalejo, Elhamdani et al. 1998; Staal, Mosharov et al. 2004) laissant passer tout ou partie du contenu vésiculaire (Burgoyne and Barclay 2002) pendant un laps de temps de l'ordre de quelques millisecondes pour les plus petites vésicules (Chen, Wang et al. 2005). Ce dernier type d'exocytose a été particulièrement étudié et mis en avant pour le recyclage des vésicules synaptiques (~50 nm) (Sullivan 2006) bien que sa prévalence soit contestée (Loguidice and Matthews 2006). Il existerait aussi pour des organites un peu plus gros comme les vésicules à cœur dense des cellules chromaffines (Artalejo, Elhamdani et al. 1998) bien qu'avec des caractéristiques très différentes de conductance et de cinétique de libération du contenu (Klyachko and Jackson 2002). Le choix entre fusion complète et « kiss-and-run » serait orchestré par des protéines (Burgoyne, Fisher et al. 2001) dont la synaptotagmine (Wang, Lu et al. 2003). La nature transitoire du pore de fusion implique probablement une régulation protéique fine, par les complexines par exemple (Archer, Graham et al. 2002), et questionne la nature protéique ou lipidique du pore de fusion (cf. 4.4.4), sachant cependant que même lors du « kiss-and-run » les deux membranes se mélangent (Taraska and Almers 2004).

2.3.2 Les granules de sécrétion : une sécrétion régulée lente ou « kiss-and-coat ».

En dehors des processus régulés rapides précités, il en existe de bien plus lents et impliquant également une fusion partielle suivie d'une reformation des organites sécrétoires. Ainsi, la libération du contenu des granules corticaux des œufs d'oursin (Whalley, Terasaki et al. 1995), de poisson (Becker and Hart 1999) et de xénope (Bement, Benink et al. 2000) permet d'observer pendant 5 s à 1 min des granules qui conservent leur forme bien que fusionnés à la membrane plasmique. Les granules de zymogène de cellules acineuse pancréatiques restent fusionnés ainsi 30 s à 15 min (Nemoto, Kimura et al. 2001; Thorn, Fogarty et al. 2004; Thorn and Parker 2005), et le record est pour les corps lamellaires des cellules alvéolaire de type II pour lesquels la libération du surfactant peut prendre plus de 30 min (Haller, Ortmayr et al. 1998; Haller, Dietl et al. 2001). Dans tous ces cas le « pore » de fusion est de 100 à 1000 fois plus grand que le pore de fusion du « kiss-and-run », le compartiment concerné 500 à 15000 fois plus large, et le contenu moins soluble voire pratiquement cristallisé (Wessel, Brooks et al. 2001). Ce mode de sécrétion est associé à la formation d'un manteau d'actine (Becker and Hart 1999; Bement, Benink et al. 2000; Sokac,

Co et al. 2003; Nemoto, Kojima et al. 2004; van Weeren, de Graaff et al. 2004) que l'on pense requis pour maintenir la structure du compartiment fusionné et qui vaut le nom de « kiss-and-coat » à cette nouvelle classe de processus de sécrétion (Sokac and Bement 2006). Sokac et coll. (Sokac, Co et al. 2003; Sokac and Bement 2006) avancent que la fusion serait l'évènement déclencheur et le point de fusion serait le site initial de la polymérisation de l'actine autour du compartiment fusionné. Je reviendrai dans la partie Discussion sur quelques implications intéressantes de ce mode de sécrétion.

2.3.3 Les lysosomes sécrétoires (LSs).

Les cellules de la lignée hématopoïétique et les mélanocytes possèdent des organites sécrétoires particuliers appelés lysosomes sécrétoires.

2.3.3.1 Morphologie, biogenèse et évolution.

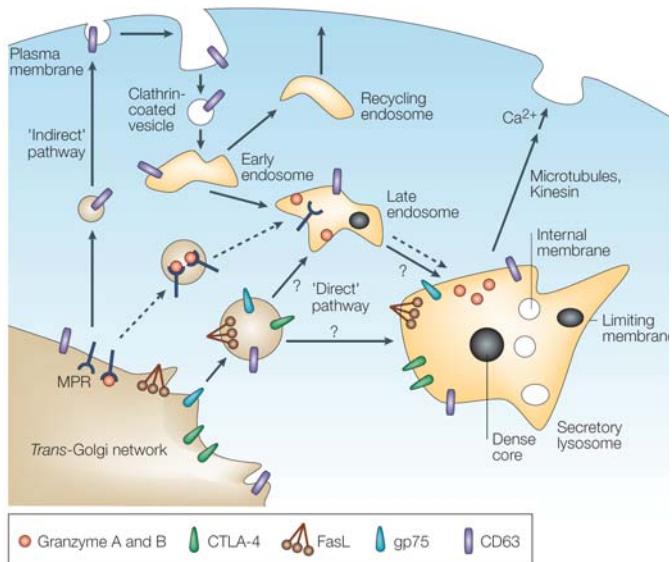
A l'instar des lysosomes conventionnels, les lysosomes sécrétoires reçoivent des lipides et protéines en provenance des voie endocytotique et biosynthétique (hydrolases). Initialement leur apparence est celle de corps multivésiculaires endosomaux de petit diamètre, qui augmentent progressivement en taille, accumulant des vésicules internes, devenant plus dense aux électrons, puis formant finalement des structures dense multilamellaires de taille conséquente (Bright, Reaves et al. 1997; Stinchcombe, Page et al. 2000) qui peuvent ultimement ressembler à des autophagosomes (Blott and Griffiths 2002).

2.3.3.2 Composition.

Les lysosomes sécrétoires sont bien des lysosomes puisqu'ils se situent à la fin de la voie d'endocytose/dégradation et contiennent les marqueurs spécifiques de lysosomes des familles LAMP (« Lysosomal Associated Membrane Protein ») (Cuervo and Dice 1996; Cuervo and Dice 2000) et Hsc70 (« Heat Shock Complex 70 ») (Chiang, Terlecky et al. 1989; Agarraberres and Dice 2001). Ils possèdent également un pH de 5,1 à 5,4 de l'ordre de celui des lysosomes conventionnels, mais contiennent des enzymes lysosomales particulières pour les granules lytiques des CTLs (« Cytotoxic Thymus Lymphocytes ») (Masson, Peters et al. 1990; Peters, Borst et al. 1991) et cellules tueuses NK (« Natural Killer ») (Burkhardt, Hester et al. 1990) (Clark and Griffiths 2003), de l'histamine et de la sérotonine pour les mastocytes et basophiles, et de la mélanine pour les mélanosomes (Griffiths 2002; Stinchcombe, Bossi et al. 2004).

Figure 28. TRAFIC DES LYSOSOMES SECRETOIRES

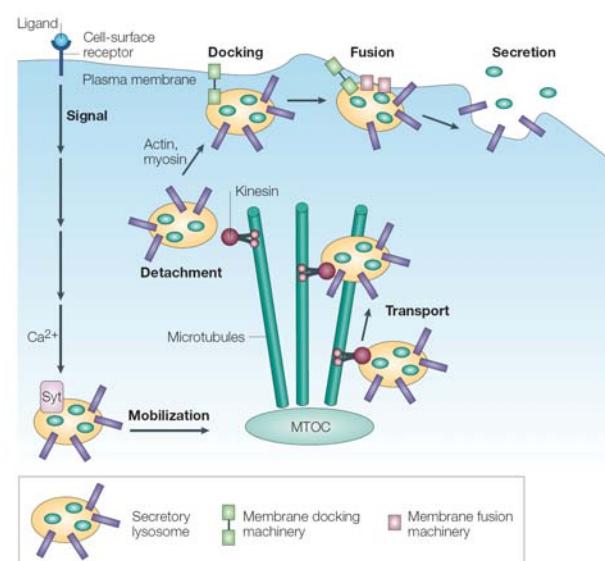
A



LEGENDE.

A : Trafic intracellulaire et adressage aux lysosomes sécrétaires. Les protéines solubles comme la granzyme A sont modifiées par le mannose-6-phosphate dans le TGN et reconnues par le récepteur au M6P (MPR). Elles sont alors transportées à l'endosome tardif (Late endosome), où elles se dissoient des MPRs, qui sont recyclés au TGN. Les protéines membranaires comme l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) sont reconnues grâce à un signal d'adressage peptidique de type tyrosine ou dileucine contenu dans leur queue cytoplasmique. Elles peuvent alors atteindre le lysosome sécrétatoire par deux voies différentes comme CD63, protéine résidente des lysosomes. Le ligand Fas et gp75 possèdent des motifs respectivement polyproline et S-V-V reconnus par des protéines à domaine SH3 et PDZ respectivement, et sont adressées directement ou via les endosomes aux lysosomes sécrétaires.

B



B : Sécrétion des lysosomes sécrétaires.

La stimulation de récepteurs de surface comme l'immunoglobuline E dans les mastocytes, déclenche une élévation de la concentration de calcium intracellulaire. Le calcium est fixé par la synaptotagmine (Syt) qui transmet ce signal pour mobiliser les microtubules du centre organisateur (MTOC). L'association du granule ou lysosome sécrétoire avec des kinésines permet son transport jusqu'au site de sécrétion, où il se détache de ces moteurs. Par l'action successive de Rabs, de facteurs d'arrimage et d'un complexe de fusion contenant des SNAREs le lysosome sécrétoire fusionne avec la membrane plasmique et sécrète son contenu (exosomes, etc.).

2.3.3.3 Adressage des protéines aux lysosomes sécrétoires.

2.3.3.3.1 Adressage des protéines destinées aux LSs (Figure 28A).

Les protéines des lysosomes sécrétoires possèdent des signatures peptidiques particulières et subissent des modifications post-traductionnelles. Pour ce qui concerne les protéines classiques de lysosomes comme LAMP1, LAMP2 et CD63, elles possèdent un motif tyrosine (YBM, « Tyrosine/Y-Based Motif ») reconnaissable par les complexes AP-1, -2, -3 (Robinson and Bonifacino 2001). Il va de même pour certaines protéines spécifiques des lysosomes sécrétoires comme GMP-17 (« Granule Membrane Protein of 17 kD ») (Medley, Kedersha et al. 1996) et CTLA-14 (« Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 ») (Iida, Ohno et al. 2000). Les protéines solubles comme les enzymes lysosomales sont généralement modifiées par le mannose-6-phosphate (M6P) qui est reconnu par des récepteurs spécifiques au M6P pour être adressées aux lysosomes (cf.1.3.5.4) (Traub and Kornfeld 1997). Il existe également des motifs internes d'adressage aux lysosomes pour certaines enzymes, qui ne nécessitent alors pas d'ajout de M6P (Glickman and Kornfeld 1993). Le ligand Fas (FasL pour « Fas Ligand ») spécifique des NKs et CTLs et qui permet l'induction de l'apoptose des cellules cibles, possède un domaine riche en proline (PRD, « Prolin-Rich Domain ») (Blott, Bossi et al. 2001). gp75/TRP-1 (« Tyrosinase-Related Protein 1 »), une enzyme de la voie de biosynthèse de la mélanine possède quant-à elle un motif di-leucine (Vijayasaradhi, Doskoch et al. 1995) reconnaissable par les complexes AP-3, et un motif Ser-Val-Val reconnu par une protéine à domaine PDZ possiblement impliquée dans son adressage (Liu, Kandala et al. 2001).

2.3.3.3.2 Protection contre la dégradation.

La façon dont ces protéines sont ensuite protégées de la dégradation par le pH acide et l'activité des hydrolases implique probablement des glycosylations des asparagines (Kundra and Kornfeld 1999), ou un contrôle de la capacité des lysosomes à dégrader leur contenu comme dans le cas des cellules dendritiques immatures (Turley, Inaba et al. 2000).

2.3.3.4 La sécrétion des lysosomes sécrétoires est régulée.

2.3.3.4.1 La dégranulation dépend d'un stimulus externe (Figure 28B).

Comme pour d'autres événements d'exocytose impliquant des granules (grains de zymogène de la cellule acineuse pancréatique plus haut, trichocystes chez la paramécie) ou des vésicules (synapse), une augmentation de la concentration cellulaire en calcium

constitue un signal déclencheur de l'exocytose. Dans le cas des NKs et CTLs, cet afflux de calcium est déclenché par le contact avec la cellule cible via des récepteurs de surface comme TcR (Lyubchenko, Wurth et al. 2001). En aval de ce signal calcium interviendraient des senseurs pour inhiber ou activer la fusion comme les synaptotagmines SytII, SytIII et SytV qui sont exprimées chez les mastocytes (Baram, Linial et al. 1998; Baram, Adachi et al. 1999). Pour le transport des granules à la membrane plasmique, les Rabs (Rab3a, Rab3d, et spécifiquement Rab27a/Ashen pour les mastocytes, CTLs et NKs, et Rab38 dans les mélanocytes (Jager, Stockert et al. 2000)) et leurs adaptateurs, ainsi que le cytosquelette et ses moteurs (kinésines, myosines comme MyoVa) sont impliqués. Pour la fusion en tant que telle, certaines SNAREs ont été trouvées associées aux lysosomes sécrétoires : la syntaxine 4, VAMP2, VAMP7 et SNAP-23 dans les mastocytes (Guo, Turner et al. 1998; Hibi, Hirashima et al. 2000; Paumet, Le Mao et al. 2000), les syntaxines 3 et 4, VAMP2 et SCAMP dans les neutrophiles (Brumell, Volchuk et al. 1995).

2.3.3.4.2 Des régulateurs spécifiques des LSs.

Trois protéines identifiées sont jusque-là considérées comme spécifiques des lysosomes sécrétoires : Rab27a, MyoVa et Lyst, et leurs mutations sont impliquées dans le syndrome de Griscelli (Certain, Barrat et al. 2000; Menasche, Pastural et al. 2000; Pastural, Ersoy et al. 2000). Les maladies affectant les lysosomes sécrétoires ont ainsi bien contribué à identifier des protéines spécifiquement requises pour leur fonction (Stinchcombe, Bossi et al. 2004). Rab27a et MyoVa seraient impliquées dans l'adressage et le transport des LSs, tandis que Lyst serait impliquée dans leur fusion avec la membrane plasmique.

2.3.4 Corps multivésiculaires (CMVs) et exosomes.

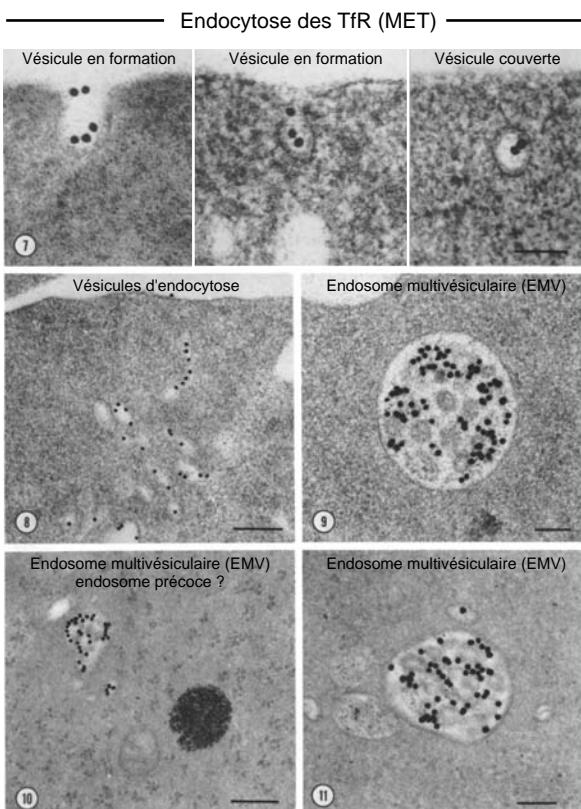
Avant toute chose, il faut préciser que CMV/MVB est un terme morphologique, et ne décrit pas a priori un seul type d'organite : ce n'est pas une dénomination fonctionnelle au départ, mais un terme générique. En revanche, les CMVs qui sécrètent des exosomes (comme on le verra plus loin) peuvent être considérés comme un type d'organite défini fonctionnellement dont les lysosomes sécrétoires cités plus haut seraient peut-être une sous-catégorie. Il faudra encore quelque temps avant que les dénominations s'harmonisent.

2.3.4.1 Découverte des CMVs / MVBs (« MultiVesicular Bodies »).

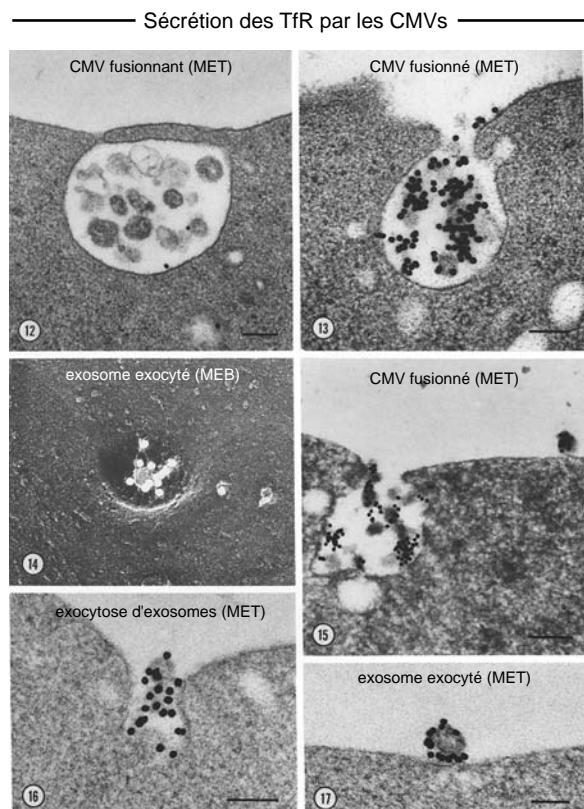
2.3.4.1.1 *Les observations précoce*s.

Figure 29. BIOGENESE ET SECRETION DES EXOSOMES VIA DES EMVs DANS LES RETICULOCYTES

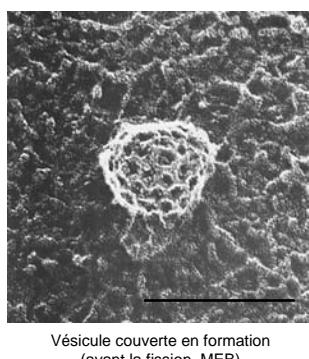
A



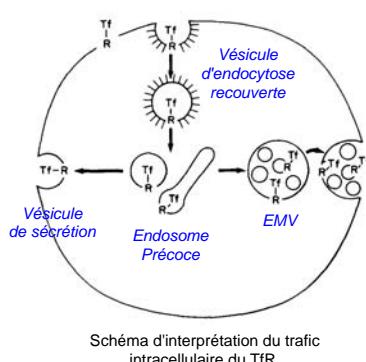
B



C



D



LEGENDE.

A : Différentes étapes de l'endocytose de la Transferrine (Tf) sont visualisées en microscopie électronique à transmission (MET) par couplage à des particules d'or, jusqu'à leur incorporation dans des endosomes multivésiculaires (EMVs).

B : Etapes de l'exocytose des vésicules des EMVs contenant les particules d'or couplées à la Transferrine, alors baptisées exosomes. Observation en MET et en ME à balayage (MEB) pour le panneau 14.

C : Vésicule couverte de clathrine en formation observée en MEB. La clathrine forme une cage autour de la vésicule qui bourgeonne sur la face interne de la membrane.

D : Représentation du trafic intracellulaire de la transferrine, de son endocytose à son recyclage via des endosomes multivésiculaires (EMVs) émettant des exosomes ou des vésicules sécrétrices selon les interprétations des auteurs. Les EMVs sont dorénavant appelés CMVs (MVBs en anglais pour "Multivesicular Bodies").

A, B, C : Les barres d'échelle font 100 nm.

Les premières observations de CMVs ont été faites grâce à la microscopie électronique à transmission dans les années 1950. Ils furent trouvés dans les neurones (Palay and Palade 1955), les érythroblastes, les macrophages, les cellules folliculaires, les cellules des epithelia ciliés, de l'épithélium intestinal, chez *Clamydomonas*, dans les cellules de sarcome de rat et les ovocytes de rat (Sotelo and Porter 1959). Ils sont décrits comme des corps de 100 à 600 nm dans lesquels on trouve des vésicules de 10 à 50 nm ou de 20 à 30 à 140 nm selon le « stade » du CMV, et un nucléoïde (présent seulement chez les CMVs des ovocytes) de 50 à 100 nm (Sotelo and Porter 1959). La nature exacte de ces différents CMVs et leur parenté n'étaient pas claires alors, d'autant qu'on ne connaissait pas encore la voie de biosynthèse/sécrétion protéique.

2.3.4.1.2 Les CMVs dans la maturation des réticulocytes.

Une description plus claire et plus fiable des CMVs fut publiée en 1983 (Harding, Heuser et al. 1983) et confirmée en 1985 (Pan, Teng et al. 1985). Les CMVs y furent appelés endosomes multivésiculaires ou éléments multivésiculaires (MVEs pour « MultiVesicular Endosomes/Elements ») et décrits comme des organites de 1 à 1,5 µm accumulant le récepteur à la transferrine (TfR) à la surface de corps vésiculaires de 50 nm de diamètre (vu par immunomarquage à l'or colloïdal). Cette description correspond plus clairement à ce qu'il est désormais commun d'appeler CMV (MVB en anglais). Le travail publié en 1983 a par ailleurs caractérisé le trafic des récepteurs à la transferrine de l'endocytose à la sécrétion de vésicules (Figure 29) appelées exosomes par la suite (Johnstone, Adam et al. 1987).

2.3.4.1.3 Les CMVs sont présents chez de nombreux types cellulaires.

En premier lieu, les CMVs furent trouvés dans la grande majorité des cellules hématopoïétiques . Ils furent également mis en évidence dans plusieurs epithelia, chez les cellules de la glande séminale de hamster (Mata, Petersen et al. 1986), dans l'épithélium et l'endothélium de cerveau de rat (Balin and Broadwell 1988), les cellules pigmentaires de la rétine (Hollyfield, Varner et al. 1985; Hunt, Dewey et al. 1989), les cellules alvéolaires de type II (Ryan, Morris et al. 1989), dans l'iléon de rat (Fujita, Reinhart et al. 1990; Wilson, Whitney et al. 1991) , dans les cellules épithéliale de la glande mammaire (Seddiki, Delpal et al. 1994), dans les cellules HepG2 (van Deurs, Holm et al. 1993; van Deurs, Holm et al. 1996), dans les cellules MDCK (Futter, Pearse et al. 1996; Gibson, Futter et al. 1998), dans les cellules Caco-2 (Durrbach, Raposo et al. 2000), etc. ainsi que chez la levure (Odorizzi, Babst et al. 1998) et dans les neurones en culture (Parton, Ockleford et al. 1987; Parton, Simons et al. 1992; Cooney, Hurlburt et al. 2002; Weible and Hendry 2004).

En fait la formation de corps multivésiculaires s'est révélée être un trait commun des compartiments endocytotiques acides : endosomes tardifs, certains compartiments de recyclage, compartiments hybrides endosome-lysosome, sans oublier les lysosomes sécrétoires présentés plus haut. Les déterminants lipidoprotéiques de ce processus ont été en partie élucidés.

2.3.4.2 Biogenèse des CMVs.

2.3.4.2.1 *Propriétés du LBPA (« LysobisPhophatidic Acide »).*

Le LBPA est un lipide spécifiquement enrichi dans les membranes internes des endosomes tardifs qui sont généralement multivésiculaires et multitubulaires (à hauteur de 15% des phospholipides totaux en rapport molaire dans les endosomes tardifs contre 1,5% en moyenne dans la cellule entière) (Kobayashi, Stang et al. 1998; Kobayashi, Beuchat et al. 1999). Le LBPA est un phospholipide très hydrophobe, non dégradable car sa conformation n'est pas reconnaissable par la majorité des phospholipases (Kobayashi and Hirabayashi 2000). Dans des liposomes mimant les conditions de pH d'endosomes tardifs (pH= 5,5 à l'intérieur, pH=7,4 en dehors), il a été montré de façon spectaculaire que le LBPA était nécessaire et suffisant pour induire la formation de vésicules internes dans les liposomes (Matsuo, Chevallier et al. 2004). Cela se produit uniquement en présence de LBPA et seulement lorsqu'un différentiel de pH correspondant aux conditions *in vivo* est appliqué, démontrant qu'*in vitro* la formation des vésicules internes ne requiert pas de protéines pour se produire.

2.3.4.2.2 *Importance du PI3P (PhosphatidylInositol 3-Phosphate).*

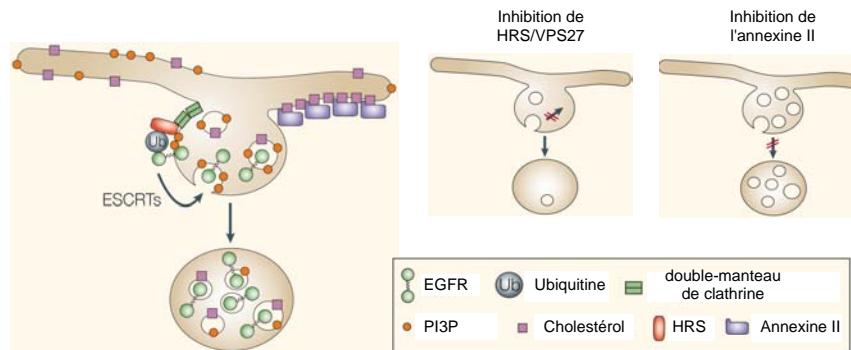
Différentes expériences montrent que le PI3P est essentiel aux CMVs. En effet, la PI3K (« PhosphatidylInositol 3-phosphate Kinase ») est nécessaire à la formation des CMVs puisque son inhibition ou son absence empêchent leur formation (Fernandez-Borja, Wubbolts et al. 1999; Futter, Collinson et al. 2001). De plus la séquestration du PI3P par des domaines en tandem FYVE inhibe spécifiquement l'incorporation de l'EGFR (« Epidermal Growth Factor Receptor ») dans des CMVs sans empêcher le trafic entre EPs et ETs (Petiot, Faure et al. 2003). L'interprétation de ces données est que le PI3P est très probablement requis pour la formation des vésicules intraluminales des CMVs et non pour leur « maturation » (Gruenberg and Stenmark 2004).

2.3.4.2.3 *Rôle des protéines : HRS et les complexes ESCRT.*

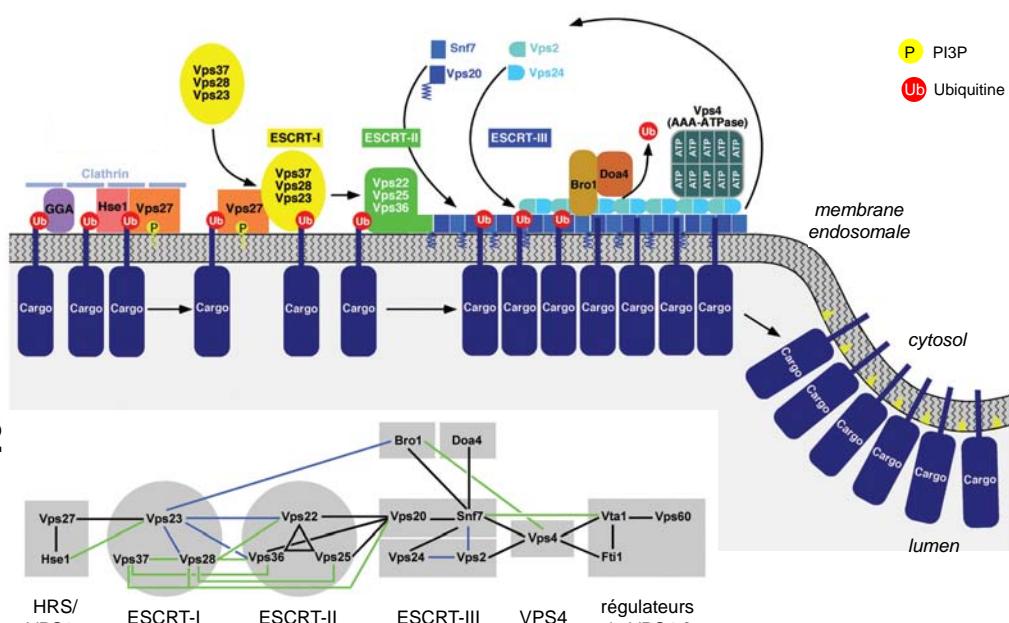
In *vivo*, même si le LBPA est présent à la membrane interne des CMVs, des protéines régulent le système. HRS/VPS27 (« Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase

Figure 30. FORMATION DES CORPS MULTI-VESICULAIRES

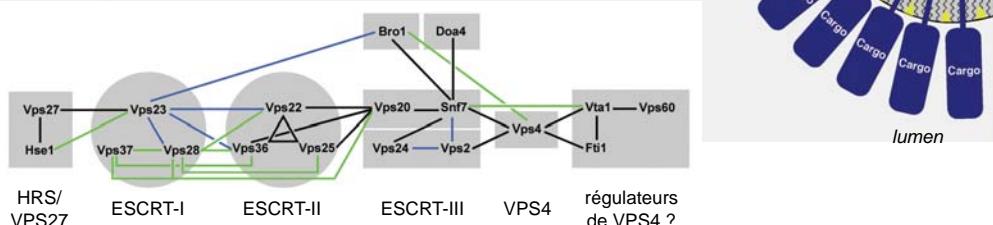
A HRS/VPS27 et annexine II dans la formation des CMVs.



B1 Formation des vésicules intraluminales



B2



LEGENDE.

A : Formation des CMVs contenant l'EGFR.

HRS/VPS27 contient un domaine FYVE qui permet son interaction avec le PI3P. Elle recrute ensuite l'EGFR ubiquitiné au niveau de domaines recouverts de clathrine non conventionnelle (aussi appelée clathrine plate). Une vésicule intraluminaire incorporant l'EGFR désubiquitiné se forme sous l'action séquentielle des complexes Escort I, II et III. La fission ultérieure du CMV implique l'annexine II associée à des microdomaines riches en cholestérol. La perte de fonction HRS/VPS27 ou son inhibition, résulte dans des CMVs contenant peu de vésicules internes, tandis que l'inhibition de l'activité de l'annexine II prévient la fission des CMVs (schémas de droite).

B1 : Composition et recrutement séquentiel des complexes HRS, ESCRT I, II, III et VPS4 au cours de la formation d'une vésicule intraluminaire. HRS se lie au PI3P par son domaine FYVE et recrute la clathrine et ESCRT-I. Les complexes ESCRT I et II possèdent des domaines de liaison à l'ubiquitine, permettant leur association au cargo ubiquitiné. Le complexe ESCRT III serait impliqué dans la vésiculogénèse, et Vps4p dans la dissociation subséquente des ESCRTs.

B2: Interactions observées en double-hybridre avec les protéines de levure (traits verts), de mammifères (traits bleus) et dans les deux systèmes (traits noirs).

Substrate », VPS-27 chez *C. elegans*, voir partie Résultats Article 2) est une protéine à domaine FYVE recrutée par le PI3P (Komada and Soriano 1999; Urbe, Mills et al. 2000; Raiborg, Bremnes et al. 2001) requise pour la formation des vésicules intraluminales (Lloyd, Atkinson et al. 2002) et l'incorporation de l'EGFR dans ces vésicules (Urbe, Sachse et al. 2003) (Figure 30A). Grâce à un domaine de liaison à la clathrine, HRS/VPS27 recrute la clathrine à la membrane limitante des endosomes précoce et des MVBs (Raiborg, Bache et al. 2001; Raiborg, Bache et al. 2002; Sachse, Urbe et al. 2002). HRS/VPS27 fixe également l'ubiquitine via un domaine UIM (« Ubiquitin Interacting Motif ») et donc les protéines transmembranaires mono-ubiquitylées comme l'EGFR (mais pas le récepteur à la transferrine), les recrutant dans les microdomaines membranaires endosomaux contenant la clathrine (Raiborg, Bache et al. 2002; Sachse, Urbe et al. 2002).

Les complexes ESCRTI, II et III sont aussi requis pour l'internalisation des récepteurs ubiquitylés dans les vésicules intraluminales des endosomes, chez la levure (Katzmann, Odorizzi et al. 2002) et les cellules de mammifères (Babst, Katzmann et al. 2002; Bishop, Norman et al. 2002). En fait HRS/VPS27 recrute les complexes ESCRT qui agissent séquentiellement (Bache, Brech et al. 2003; Katzmann, Stefan et al. 2003).

FAB1/PIKFYVE est une enzyme qui phosphoryle le PI3P en PI(3,5)P2, est localisée à la membrane des endosomes et requise pour l'internalisation de certaines protéines dans les CMVs (Odorizzi, Babst et al. 1998; Reggiori and Pelham 2002; Sbrissa, Ikonomov et al. 2002). Son rôle exact n'est pas compris mais le PI(3,5)P2 pourrait être un activateur du complexe ESCRTIII dont la sous-unité VPS24 fixe le PI(3,5)P2 (Whitley, Reaves et al. 2003).

2.3.4.2.4 Comment concilier les lipides et les protéines ; qui fait quoi finalement ?

Un dernier acteur clef de la formation des vésicules internes serait Bro1/Alix. C'est une protéine VPS de classe E capable de fixer le LBPA, et d'inhiber la formation de vésicules internes dans le système de liposome évoqué plus haut (Matsuo, Chevallier et al. 2004; Cabezas, Bache et al. 2005). Ce dernier acteur permet en partie de comprendre pourquoi ces vésicules ne se forment pas anarchiquement *in vivo*. Un modèle synthétique de formation des vésicules intraluminales est ainsi actuellement possible (Babst 2005) (Figure 30B). Le PI3P aurait pour rôle initial le recrutement en cascade des complexes (HRS, clathrine, ESCRT) nécessaires au tri des protéines à internaliser, puis interviendrait le LBPA pour permettre la vésiculogenèse sous le contrôle d'Alix.

2.3.4.2.5 Fission des CMVs.

Je me suis concentré jusqu'à présent sur la formation des vésicules intraluminales. Cependant, suivant le modèle de formation des compartiments endosomaux dit « des compartiments stables » (par opposition à un modèle proposant une maturation d'un même

compartiment d'EP à ET puis lysosome) les CMVs doivent à un moment ou à un autre « quitter » leur compartiment d'origine : l'EP. Ce processus impliquerait chez les mammifères l'annexine-2, puisque son inactivation par ARNi induit un défaut de traffic entre les EPs et les ETs sans compromettre la formation de vésicules internes (Mayran, Parton et al. 2003). La fission impliquerait l'actine via l'organisation de plateformes particulières recrutées par l'annexine-2 (Gruenberg and Stenmark 2004) (Figure 30A).

2.3.4.3 Composition des exosomes.

Les exosomes les mieux caractérisés en termes de composition sont ceux des cellules de la lignée hématopoïétique (Thery, Zitvogel et al. 2002) et des cellules intestinales (van Niel and Heyman 2002), tous impliqués probablement dans la présentation d'antigènes et l'activation des lymphocytes T CD4 positifs. Des analyses biochimiques ont été réalisées pour déterminer leur composition à partir de cellules dendritiques (Thery, Regnault et al. 1999; Thery, Boussac et al. 2001) et mastocytes en culture (Laulagnier, Motta et al. 2004), de lymphocytes B (Wubbolts, Leckie et al. 2003), d'échantillons d'urine humaine (Pisitkun, Shen et al. 2004), de biopsies intestinales (Lin, Almqvist et al. 2005). En revanche, les données sur les compositions d'exosomes issus de cellules épithéliales non impliqués a priori dans la présentation d'antigènes manquent.

2.3.4.3.1 Composition lipidique.

Les exosomes des cellules dendritiques et des mastocytes présentent un enrichissement en sphingomyéline, phosphatidyléthanolamines, un appauvrissement en phosphatidylcholine et contrairement à leur compartiment d'origine, ne semblent pas enrichis en cholestérol ni en LBPA (Laulagnier, Motta et al. 2004). Les exosomes contiennent néanmoins des DRMs ou radeaux lipidiques (de Gassart, Geminard et al. 2003).

2.3.4.3.2 Composition protéique.

Au niveau protéique, on trouve quelques enzymes cytosoliques, chaperonnes, facteurs associés au cytosquelette et protéines du cytosquelette, qui se retrouvent probablement là du fait du mode de formation des exosomes au niveau des CMVs, où l'invagination des vésicules entraîne probablement du cytosol. La composition en protéines membranaires et associées aux membranes est probablement plus informative. On trouve ainsi de façon récurrente les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC de classes I et II), des immunoglobulines, des protéines d'adhésion (intégrines), des protéines de la machinerie de trafic et de fusion (Rabs, annexines), et une famille de protéine semble-t-il typique de cet environnement : les tétraspanines.

2.3.4.4 CMVs et exosomes, une voie de sécrétion sous-estimée ?

2.3.4.4.1 Propriétés des exosomes.

Les exosomes sont donc des vésicules de 40 à 90 nm (plus fréquemment 50 nm) sécrétées par des CMVs. Leur taille leur permet de contenir différents microdomaines membranaires, différents ligands et récepteurs et d'interagir avec les membranes plasmiques d'autres cellules, éventuellement pour induire une signalisation intracellulaire. D'autre part, les exosomes possèdent probablement la machinerie de fusion nécessaire à leur fusion avec la membrane plasmique, et pourraient ainsi contribuer à la formation de microdomaines au niveau de la cellule émettrice elle-même ou d'une cellule cible différente.

2.3.4.4.2 Quel est l'éventail des types cellulaires concernés ?

Les exosomes ont d'abord été caractérisés dans les cellules de la lignée hématopoïétique : réticulocytes, CTLs, lymphocytes B transformés par le virus d'Epstein-Barr (EBVTBC pour « Epstein-Barr-Virus Transformed B Cells »), cellules dendritiques (Raposo, Nijman et al. 1996), mastocytes, plaquettes sanguines.

Ils ont également été observés dans différents epithelia plus fréquemment basolatéralement : cellules intestinales humaines (van Niel and Heyman 2002; Lin, Almqvist et al. 2005; Mallegol, van Niel et al. 2005), cellules de glande salivaire humaine (Kapsogeorgou, Abu-Helu et al. 2005), cellules ARPE-19 (McKechnie, Copland et al. 2003), cellules de disques imaginaux de drosophile (Greco, Hannus et al. 2001), cellules du nœud chez la drosophile (Tanaka, Okada et al. 2005), cellules neuroépithéliales chez l'embryon de souris (Marzesco, Janich et al. 2005),

2.3.4.4.3 Quels processus développementaux et physiologiques en dépendent ?

La capacité de la plupart des cellules de la lignée hématopoïétique à sécréter des exosomes est probablement à attribuer à un rôle dans la réponse immunitaire. Les exosomes contiennent des plates-formes de signalisation complexes capables de porter différents antigènes et protéines de reconnaissance et d'adhésion, sont très immunogènes (Thery, Duban et al. 2002), et capables de circuler à longue distance. Il a également été montré qu'ils sont efficacement endocytés par les cellules dendritiques et des macrophages spécialisés (Morelli, Larregina et al. 2004). Ces caractéristiques en font des médiateurs efficaces de la réponse immunitaire (Chaput, Taieb et al. 2005), utilisables en cancérothérapie (Mignot, Roux et al. 2006).

Il est intéressant de noter que les exosomes basolatéraux présentateurs de CMHII en l'absence de cofacteurs stimulants seraient impliqués dans la tolérance plutôt que dans

l'activation de cellules immunitaires par les cellules intestinales. En cas d'infection par un pathogène en revanche, la composition des exosomes serait modifiée et l'incorporation de co-activateurs rendrait les exosomes très immunogènes (van Niel and Heyman 2002; Morelli, Larregina et al. 2004).

Les exosomes apicaux intestinaux quant-à eux n'ont pas de rôle attribué mais pourraient être impliqués dans le recyclage des particules virales qui parviennent à détourner le processus de sécrétion d'exosomes pour infecter les cellules (van Niel and Heyman 2002).

En effet, différents agents infectieux utiliseraient la voie de biogenèse des exosomes pour se propager et infecter les cellules, notamment les rétrovirus à enveloppe comme le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) et le virus d'Epstein-Barr (Pelchen-Matthews, Raposo et al. 2004). Le prion pourrait également utiliser les exosomes pour se propager rapidement sur de longues distances (Fevrier, Vilette et al. 2005).

Les exosomes remplissent également d'autres fonctions. Ainsi dans les réticulocytes en maturation, il s'agit essentiellement de se « débarrasser » de composants inutiles et difficiles à dégrader par la voie lysosomale. Cette fonction pourrait être la fonction initiale des exosomes (Thery, Zitvogel et al. 2002).

Enfin, il apparaît depuis peu, que des particules de type exosomes, sécrétées par certaines cellules épithéliales, seraient impliqués dans la diffusion de morphogènes à longue distance et peut-être l'établissement de leurs gradients (Greco, Hannus et al. 2001; Entchev and Gonzalez-Gaitan 2002; Tanaka, Okada et al. 2005; Eaton 2006).

3 Le modèle d'étude : la sécrétion apicale de la cuticule de *C. elegans* par l'épiderme.

3.1 *C. elegans*, organisme modèle en biologie.

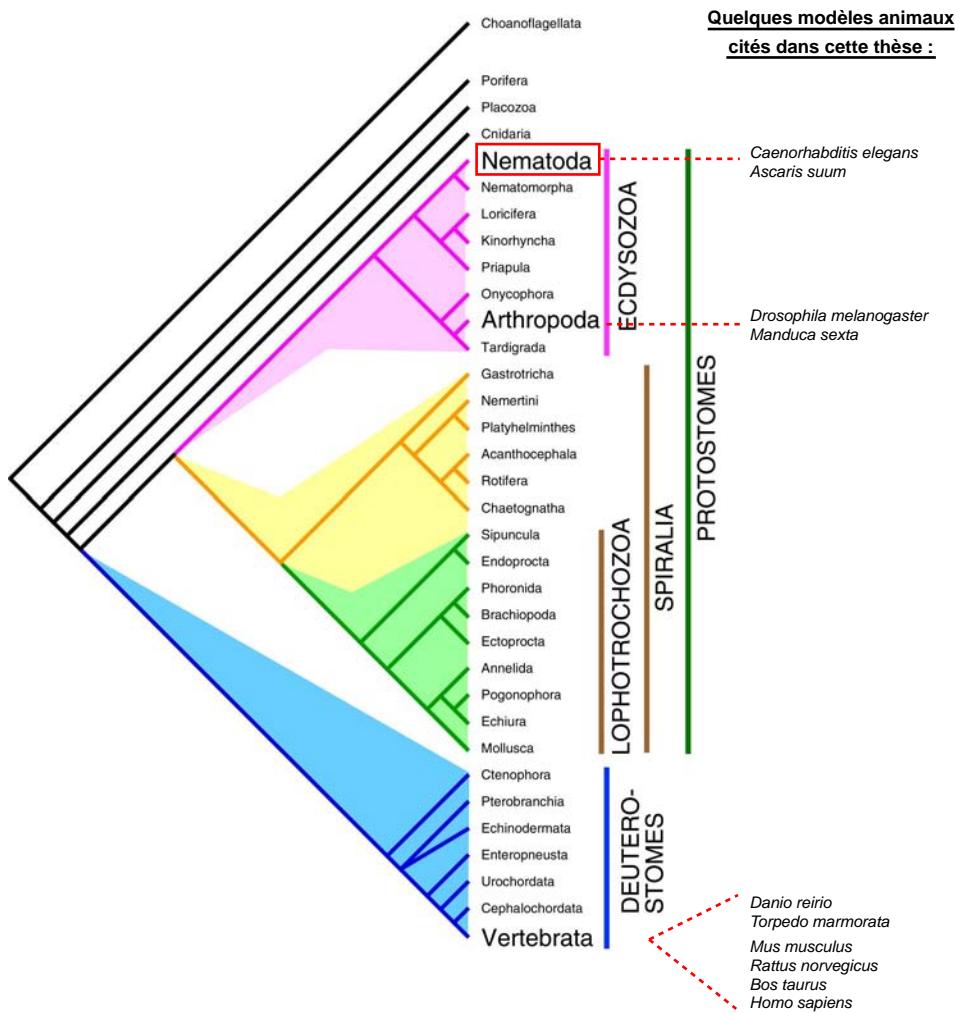
Discours de Sydney Brenner au Prix Nobel de Physiologie et de Médecine 2002 :

« In my paper, I put it in this way: "Behaviour is the result of a complex ill-understood set of computations performed by nervous systems and it seems essential to decompose the question into two: one concerned with the question of the genetic specification of nervous systems and the other with the way nervous systems work to produce behaviour." Thus, just as the structure and function of protein molecules is the necessary connection between the genes and metabolism, the link between genes and behaviour resides in understanding the structure of nervous systems and how they are constructed. These are questions of anatomy and embryological development. This set the requirements for the experimental organism as one which was not only suitable for genetical study in the laboratory but also allowed the structure of the nervous system to be accurately defined. Since a nervous system is essentially a cellular network, we had to be able to observe junctions between cells and their processes and this could only be achieved with the electron microscope which has the necessary resolution. Since the electron microscope provides only a small window because of its high magnification, we needed a small animal which would also need to have a nervous system with a small number of cells. After some searching, my choice finally settled on the small nematode, *Caenorhabditis elegans*. This was a self-fertilizing hermaphrodite with rare spontaneous males. The adults are about 1 mm in length and the life cycle is completed in 3 1/2 days. The animals live in a two-dimensional world feeding on E. coli on the surface of agar plates. They are easy to grow in bulk, each animal producing about 300 progeny during a cycle. »

3.1.1 Classification.

C. elegans est un organisme cellulaire eucaryote (empire) métazoaire (règne) triploblastique bilatérian, comportant donc les trois feuillets embryonnaires : ectoderme, endoderme et mésoderme, et possédant une véritable symétrie bilatérale, un système nerveux et des muscles. C'est un protostomien à l'instar des mollusques et arthropodes, il

Figure 31. LES DIFFERENTS PHYLA DU MONDE ANIMAL.



LEGENDE.

C. elegans est un nématode (rectangle rouge). Il fait donc partie des ecdysoa (animaux qui subissent des mues larvaires) comme les arthropodes.

appartient au phylum des nématodes (De Ley and Blaxter 2004), (Figure 31) comme un grand nombre de vers parasites (*Ascaris*, *B. malayi*, *W. bancrofti*...). Les nématodes sont classiquement considérés comme des pseudocoelomates (NCBI :

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&name=Cae_norhabditis+elegans&lvl=0&srchmode=1), en accord avec quelques récentes publications (Wolf, Rogozin et al. 2004), et donc placés dans une branche distincte des coelomates comportant arthropodes et vertébrés. Cependant, un nombre croissant de scientifiques rangerait plus volontiers les nématodes dans les cuticulaires ecdysozoaires (Aguinaldo, Turbeville et al. 1997), (Figure 31) qui regroupent les animaux subissant des mues cuticulaires comme les arthropodes, notamment sur la base de l'évolution des séquences introniques (Roy and Gilbert 2005). L'un des avantages notables de l'approche « intronique » est son insensibilité aux variations des taux de mutations entre branches évolutives (Roy and Gilbert 2005; Roy and Gilbert 2005). La difficulté d'établir clairement l'appartenance phylogénétique des nématozoaires résulterait essentiellement du phénomène d'attraction des longues branches qui rendrait critique le choix des taxons du groupe externe servant à enracer l'arbre phylogénétique (Jones, Durose et al. 2005).

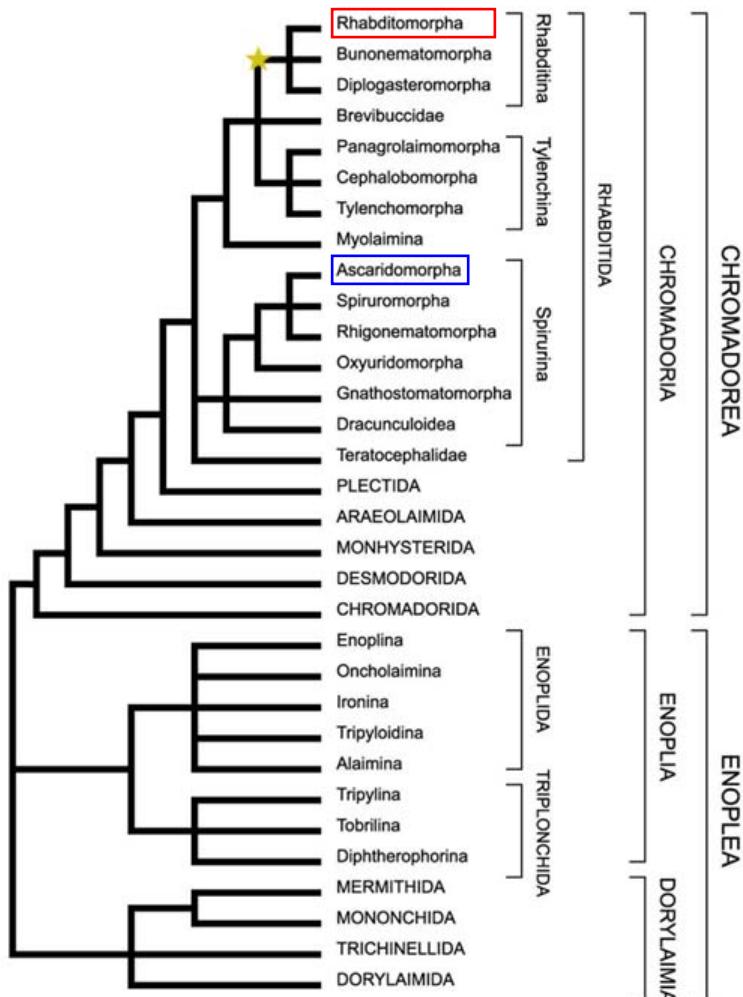
Plus précisément, *C. elegans* est de la classe des chromadoriens (comprenant beaucoup de nématodes parasites comme les ascarides) caractérisés notamment par une cuticule chimiquement étanche, de l'ordre des rhabditides (dans lequel on trouve entre autres les diplogastrids avec le genre *Pristionchus*, (Kiontke and Fitch 2005), de la famille des rabditidés (Figures 32 et 33) et du genre *Caenorhabditis*.

3.1.2 Généralités anatomiques (Figure 34).

C. elegans est un nématode (phylum contenant plus de 20000 espèces) vermiforme de section ronde, transparent, d'environ 1 mm au stade adulte qui vit naturellement dans les environnements humides où l'on retrouve une grande densité de microorganismes (humus, matière organique en décomposition...). Il possède une tête pourvue d'un orifice buccal lui servant à ingérer les bactéries dont il se nourrit, et une queue où s'ouvre un orifice anal. Il se déplace de côté, plus volontiers vers l'avant mais peu aussi bien le faire dans l'autre sens. Pour cela il effectue un mouvement sinusoïdal en « dérapant » sur un film d'eau qui le « colle » au support par capillarité en même temps qu'il le protège de la dessiccation auquel le ver est très sensible. Ses mouvements sont réalisés grâce à la coordination des muscles longitudinaux par le système nerveux locomoteur.

C'est un ver non métamérisé (contrairement aux annélides comme les néréides et le lombric), composé de 1031 cellules pour le mâle X0 (représentant généralement moins de

Figure 32. PHYLOGENIE DES NEMATODES.

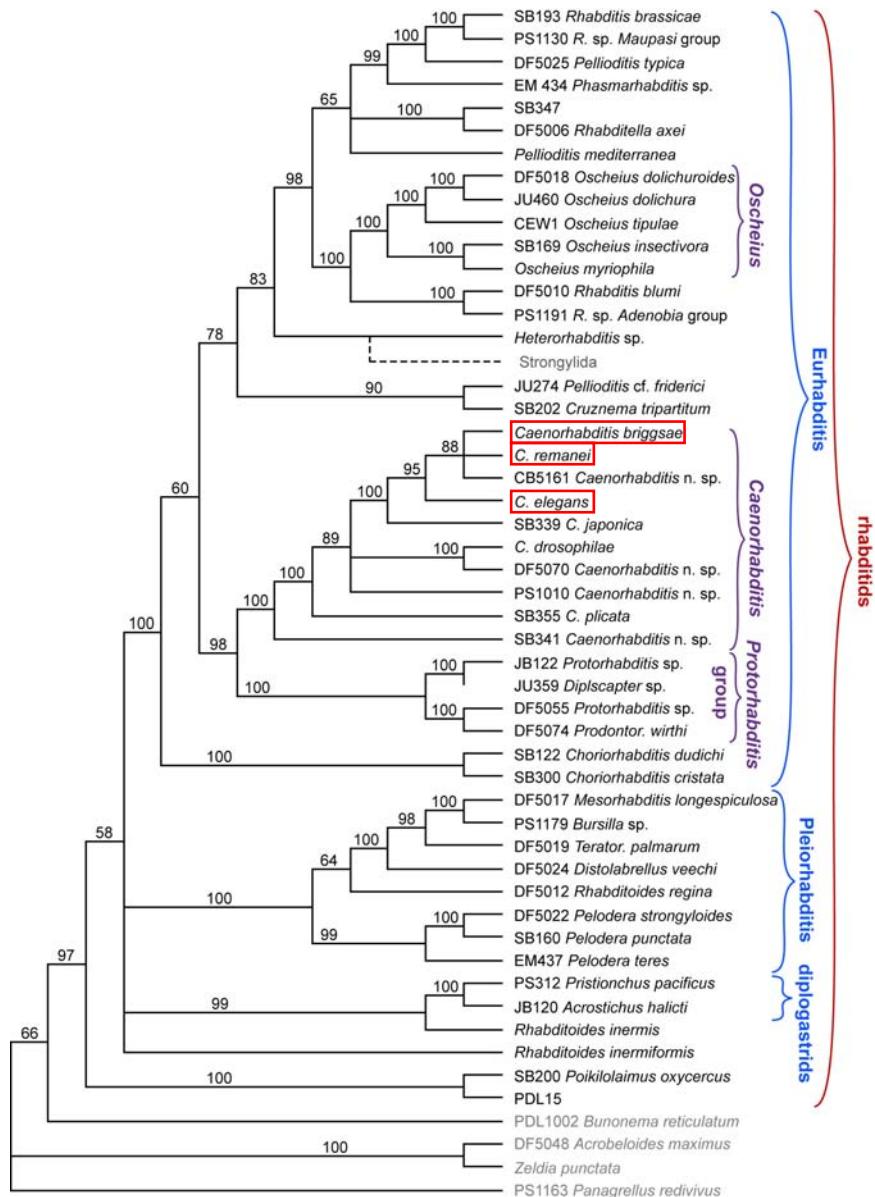


Modified slightly from: Paul De Ley & Mark Blaxter 2002. Systematic position and phylogeny. Pages 1-30 in: (Donald L. Lee, ed.) The Biology of Nematodes. Taylor & Francis, London and New York. [Fig. 1.6, p. 11.]
Note: "Rhabditomorpha", "Bunonematomorpha", and "Diplogasteromorpha" encompass taxa

LEGENDE.

Récente classification des nématodes (2002). *C. elegans* appartient au groupe des rhabditomorphes (encadré rouge). *Ascaris suum* le parasite intestinal appartient lui aux ascaridomorphes (encadré bleu).

Figure 33. LES RHABDITIDES



LEGENDE.

Phylogénie des rhabditides. Les trois rhabditides dont les génomes sont séquencés sont indiqués par des rectangles rouges.

0,2% de la population dans la nature) et de 959 cellules pour l'hermaphrodite XX. L'hermaphrodite est capable de s'autoféconder et d'engendrer uniquement des hermaphrodites (hors défaut de ségrégation du X au cours de la méiose), ou de croiser avec un mâle, dont le sperme fécondera prioritairement (par rapport au sperme de l'hermaphrodite) les ovules de l'hermaphrodite qui donnera alors une descendance F1 composée pour moitié de mâles. Un hermaphrodite pond en moyenne 250 à 300 œufs, voire davantage lorsqu'il est fécondé par un mâle.

3.1.3 Le génome de *C. elegans*.

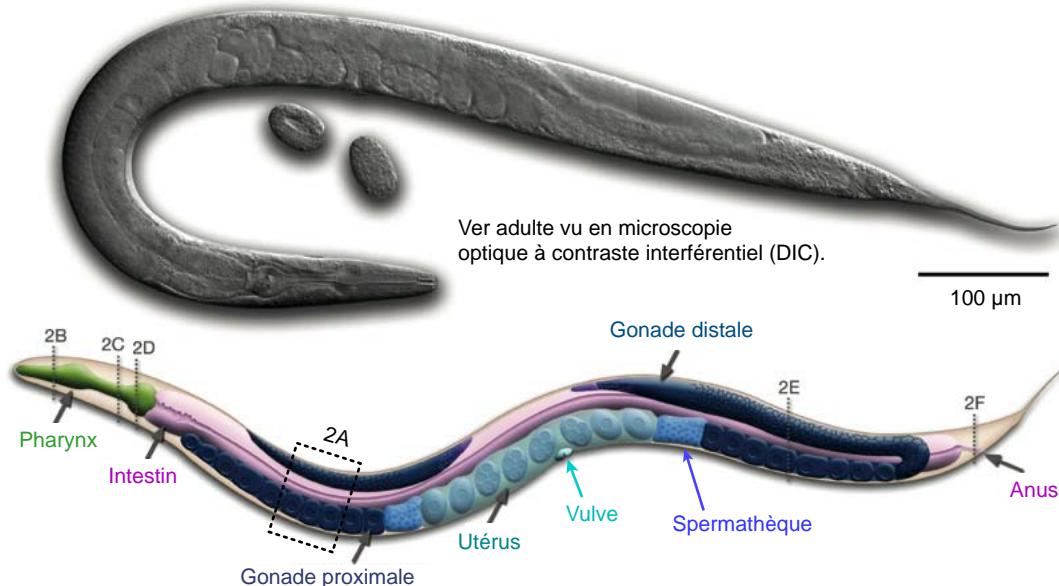
Premier génome métazoaire séquencé en 1998 (1998), il est composé de 100 millions de paires de bases représentant 19 282 gènes dont 53% comportent de fortes similarités de séquence avec des gènes d'autres organismes (Kurz and Pujol 2002). Ce génome est réparti sur 5 paires d'autosomes (I à V) et un (mâle : X0) ou deux gonosomes (hermaphrodite :XX). Il est aussi caractérisé par une faible proportion de séquences répétées, des introns courts (Annexe 16), et qui ont subit une évolution qualitativement différente de celle des autres organismes (Roy and Gilbert 2005).

3.1.4 Développement et cycle de vie de *C. elegans*.

3.1.4.1 Développement en conditions d'abondance.

Il s'écoule 3 jours à 20°C de l'œuf fécondé à l'adulte. Après fécondation l'œuf contenant des granules de réserves énergétiques, accomplit les premières divisions jusqu'à atteindre un peu plus d'une centaine de cellules en environ 4 heures, stade auquel l'œuf est généralement pondu. Le développement embryonnaire post-ponte dure environ 14h durant lesquelles l'embryon continue de se diviser et d'utiliser les réserves énergétiques stockées dans les granules. A l'issue du développement embryonnaire éclosion une larve « L1 ». L'organogenèse est alors quasi-terminée (à l'exception essentiellement du système reproducteur) et l'essentiel des lignages ont fini de se diviser. Des divisions cellulaires supplémentaires se produiront (principalement dans les tissus épithéliaux : gonade somatique, vulve, épiderme ; et certains neurones) pour passer d'une larve L1 de 558 cellules à 959 cellules chez l'adulte hermaphrodite (Sulston and Horvitz 1977). Quatre stades larvaires se succèdent entre l'éclosion et l'adulte, appelés L1 à L4 et séparés par des

Figure 34. ANATOMIE DE L'ADULTE HERMAPHRODITE *C. elegans*.



2A, 2B, 2C, 2D, 2E : coupes transversales à différents niveaux du ver.

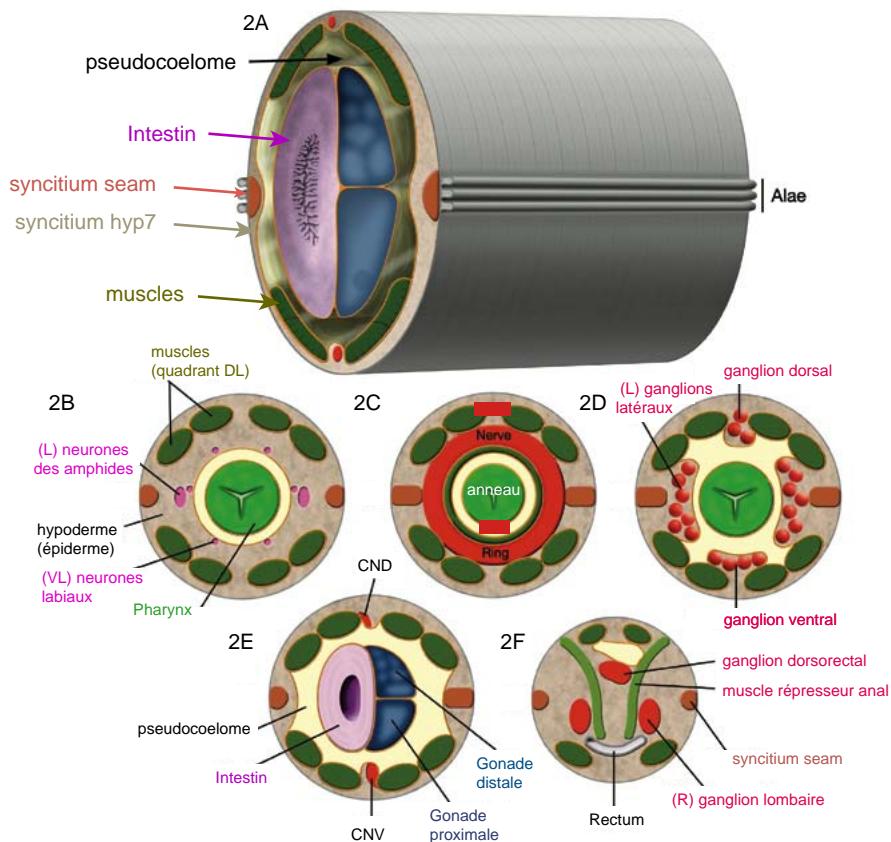
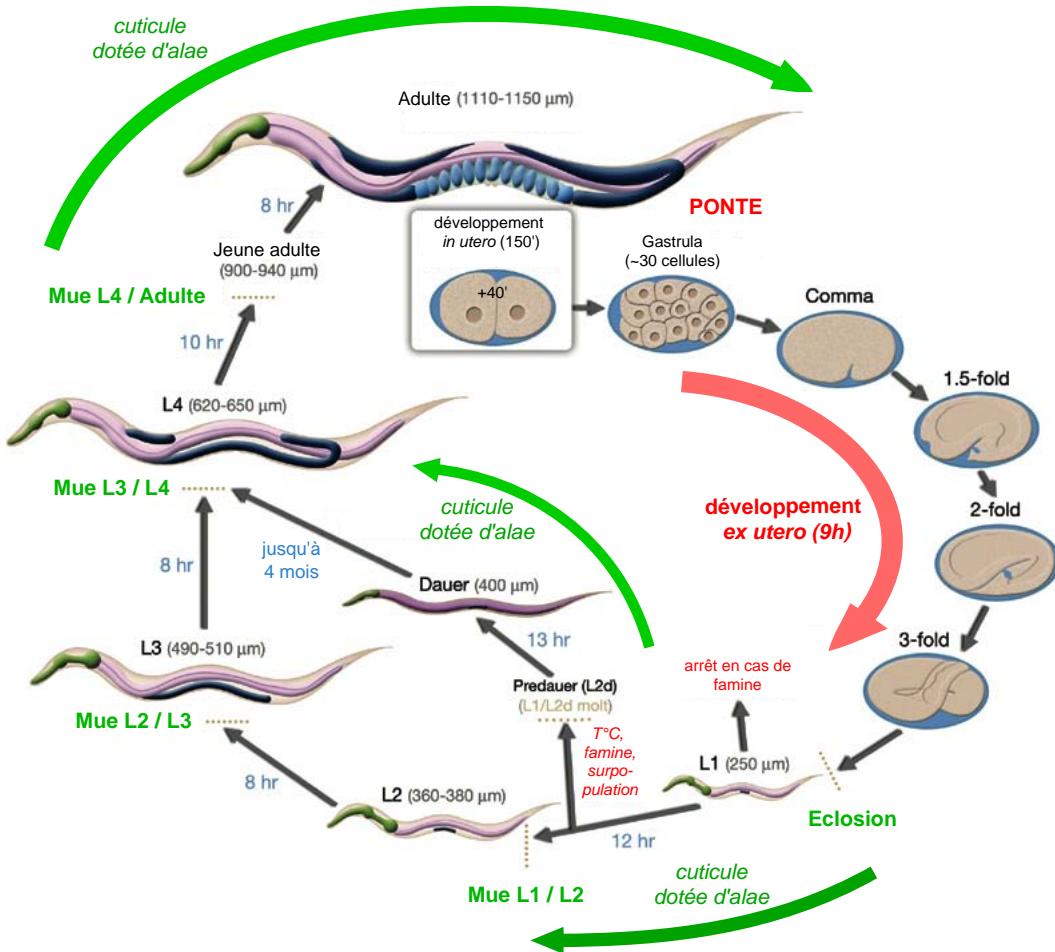


Figure 35. CYCLE DE VIE DE *C. elegans*.



LEGENDE.

Cycle de vie du nématode *C. elegans* à 25°C. La première partie du développement se déroule dans l'utérus de l'hermaphrodite adulte avant que l'oeuf ne soit pondu et finisse son développement embryonnaire ex utero, en utilisant les réserves énergétiques initialement importées dans l'oeuf (granules vitellins). A l'éclosion, les larves L1 se nourrissent dans le milieu. 4 mues surviennent successivement pour permettre à l'animal de croître jusqu'à sa taille adulte, définissant les stades L2, L3, L4. L'ensemble du cycle prend près de 2,5 jours à 25°C, 3 à 3,5 jours à 20°C et près de 5 jours à 15°C.

En cas de famine, de surpopulation, ou d'élévation de la température.) les larves L1 peuvent emprunter une voie développementale particulière qui permet la formation d'individus "dauer" qui ne se nourrissent plus, présentent un métabolisme particulier et ralenti, et peuvent survivre ainsi plus de 4 mois sans croître. Le retour au cycle de vie normal se fait du stade "dauer" au stade L4 lorsque les conditions de vie s'améliorent.

mues au cours desquelles l'ancienne cuticule est abandonnée au profit d'une nouvelle (Figure 35).

3.1.4.2 Diapause.

C. elegans vit dans le sol, où les conditions de vie sont très variables contrairement aux milieux dans lesquels nous les cultivons. Pour faire face à des conditions rudes (températures basses, sécheresse relative, famine), le ver peut survivre plusieurs jours au stade L1 sans s'alimenter, ou entrer dans un stade différent du stade L2 classique qui le prépare au stade de diapause (stade « dauer ») auquel il peut survivre plusieurs mois (Figure 35). Lorsque le ver est en diapause, sa cuticule est plus dense, quasi-imperméable et tous les orifices (buccal, anal, excréteur) sont bouchés pour limiter les pertes d'eau. L'entrée en diapause ou pas est déterminée par le ratio entre une phéromone émise par les vers (daumone) et la concentration de carbohydrates émis par les bactéries nutritives. La surpopulation ou le manque de nourriture augmentent ce ratio, induisant l'entrée en dauer. A ratio daumone/carbohydrates donné une élévation de la température peut aussi induire l'entrée en dauer.

3.2 *Les epithelia chez C. elegans*

Trois types d'*epithelia* ont été l'objet de mes études lors de cette thèse, je reviens donc ici sur quelques unes de leurs particularités après avoir introduit la notion de cellule épithéliale chez *C. elegans*.

3.2.1 Que sont les epithelia chez *C. elegans* ?

3.2.1.1 Qu'est-ce qu'un épithélium ?

Un épithélium est un tissu composé de cellules polarisées solidaires grâce à des jonctions intercellulaires (jonctions serrées apicales par exemple) en contact d'une part avec la cavité interne de l'organisme du côté basal, et avec le milieu extérieur du côté apical. La nutrition de ce type de tissu se fait par la lame basale ou membrane basale, mais éventuellement aussi par endocytose d'aliments et nutriments trouvés dans le milieu extérieur. Les fonctions non exclusives classiquement réalisées par les *epithelia* sont la régulation des échanges avec le milieu extérieur (*epithelia* rénal, intestinal ou pulmonaire), la sécrétion de composés (phéromones diverses, enzymes, peptides antimicrobiens, composés

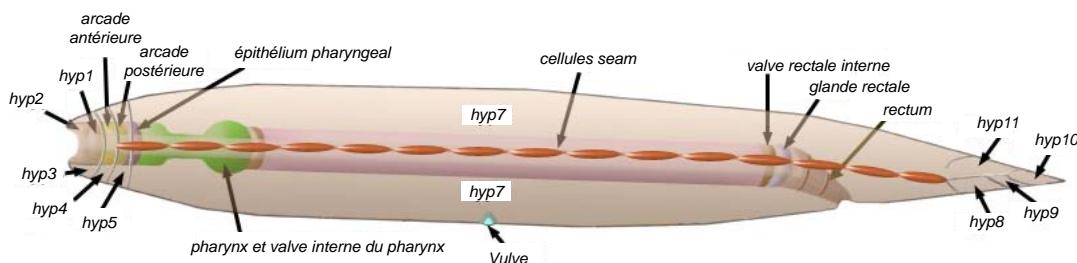
Figure 36. CELLULES ET SYNCYTIA EPIDERMIIQUES DE *C. elegans*.

A

Cellule	Syncytium	Nombre de noyaux
Hyp 1	oui	3
Hyp 2	oui	2
Hyp 3	oui	2
Hyp 4	oui	3
Hyp 5	oui	2
Hyp 6	oui	(6) fusion avec hyp7 à mi-L3
Hyp 7	oui	139 (144 chez le mâle) correspondant à : 23 nembrvronnaires dont "hyp13". 116 post-embryonnaires dont 98 des seam, 12 des cellules P (dont hyp12) et 6 de hyp6.
Hyp 8**	non	1
Hyp 9**	non	1
Hyp 10**	oui	2
Hyp 11**	non	1
Hyp12		(1) (P12.pa) fusionne avec hyp7
Hyp13 (mâles)	oui	(2) (AB.pl/rappppa;sœurs des cellules T) fusionne avec hyp7

** Jusqu'au stade mi-L4, les cellules hyp8 à hyp-11 présentent la même organisation chez l'hermaphrodite et le mâle. Après mi-L4, hyp8, hyp11, hyp9 et finalement hyp10 fusionnent.

B



LEGENDE.

A : Liste des tissus épidermiques, nombre de cellules associées et évènements de fusion.

B : Tissus ectodermiques du ver adulte hermaphrodite. Noter que les cellules seam forment deux syncytia latéraux, où les cellules sont connectées par du cytoplasme à partir de la fin du stade L4. Les cellules P épidermiques, hyp6, hyp12 et hyp13 ne sont pas présentes chez l'adulte où elles ont fusionné avec hyp7 (image modifiée du site www.wormatlas.org).

structuraux, etc.) dans le milieu extérieur. Ils jouent ainsi fréquemment un rôle protecteur pour garantir l'intégrité de l'organisme. Plus rarement, ils jouent un rôle mécanique (*epithelia* associés à des exosquelettes, *mesothelia*), ou circulatoire (*endothelia*). Enfin, les *epithelia* jouent un rôle clef dans le développement et la morphogenèse embryonnaire des animaux (mouvements de fermeture ventrale ou dorsale, intercalations, élongation, mise en place de structures tubulaires, etc.). Les cellules épithéliales sont généralement robustes, dotées d'un métabolisme très actif (pour garantir l'homéostasie il faut investir de l'énergie), et du coup plus sujettes à la tumorigénèse d'autant que leur position les exposent davantage aux agents mutagènes.

3.2.1.2 Diversité anatomique et fonctionnelle des *epithelia* chez *C. elegans*.

Les *epithelia* chez *C. elegans* comprennent l'épiderme (majeur et mineur) qui couvre l'intégralité du corps de l'animal, le système digestif (cellules épithéliales du pharynx, intestin, rectum, anus), les cellules du système excréteur (cellules glandulaires, excrétrice, conduit et pore), les cellules du système reproducteur somatique (paroi de la gonade, utérus, cellules épidermiques de la vulve), les cellules support (parfois appelées à tort cellules « gliales ») des organes chimiosensoriels (cellules gaines et socles) (Figure 36). Ainsi, on retrouve chez *C. elegans* les types cellulaires épithéliaux essentiels et leurs fonctions associées : osmorégulation, excrétion, nutrition, signalisation, défense immunitaire, sécrétion d'enzymes, et de composés structuraux, morphogenèse (Annexe 17), relai mécanique entre l'exosquelette cuticulaire et les muscles locomoteurs, etc.

3.2.2 Le lignage épithelial chez *C. elegans*.

3.2.2.1 Un lignage complexe.

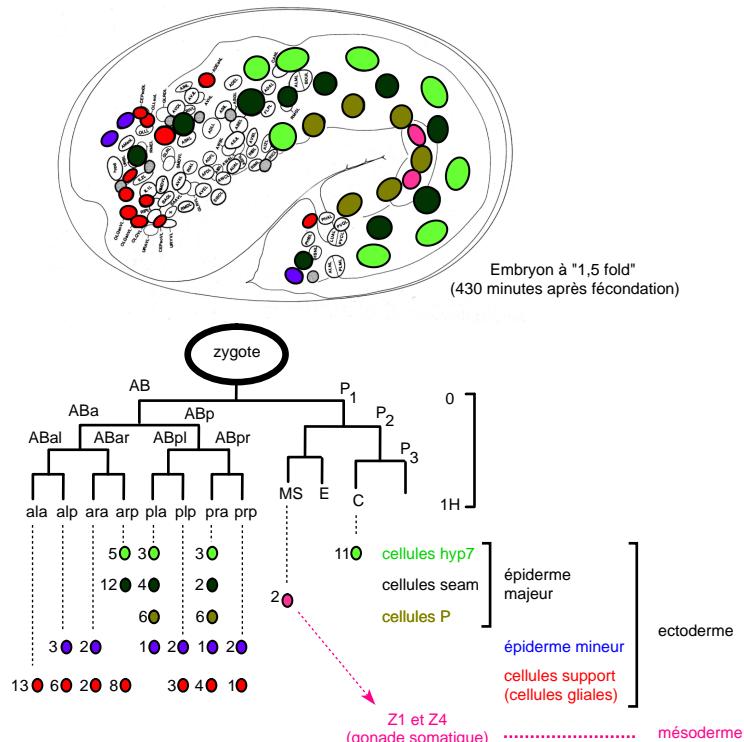
Pour la plupart des *epithelia* de *C. elegans*, plusieurs lignages vont donner le même type de cellule épithéliale et ainsi contribuer à former le même tissu. Inversement, chacun de ces lignages va également générer d'autres types cellulaires épithéliaux ou non (Figure 37).

3.2.2.2 Un lignage en divisions actives jusqu'à la transition L3 - L4.

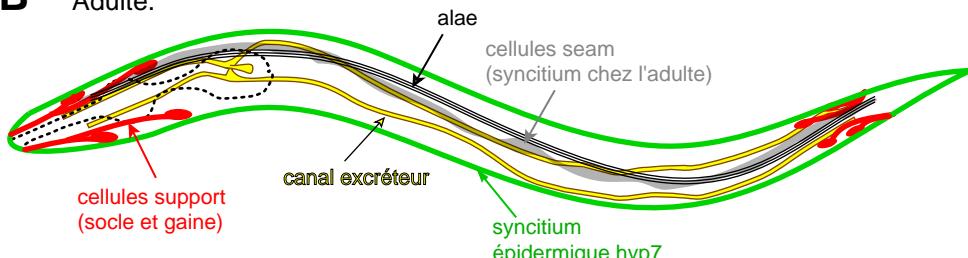
Quand la plupart des lignages cellulaires interrompent leurs divisions cellulaires avant le stade L1, plusieurs types de cellules épithéliales, musculaires et neuronales, continuent de

Figure 37. DEVELOPPEMENT DES TISSUS EPITHELIAUX CHEZ *C. elegans*.

A Lignage épithéial



B Adulte.



LEGENDE.

A : Lignage épithéial chez l'embryon de *C. elegans*. L'emplacement chez l'embryon à "1,5 fold" des cellules à l'origine des tissus épithéliaux est indiqué par un code couleur repris dans la représentation du lignage. Les épithelia de *C. elegans* proviennent de différentes lignées de type ectodermique et mésodermique. Il dérivent essentiellement de la lignée AB, mais la plupart des cellules hyp7 de l'épiderme majeur dérive de la lignée de P1, ainsi que les cellules Z1 et Z4 de la gonade somatique. D'autre part, les "progéniteurs" alp, ara, arp, pla, plp, pra, prp génèrent de deux à trois types cellulaires différents, montrant également qu'à un type cellulaire donné, ne correspond pas un progéniteur.

B : Représentation schématique des quatre épithelia auxquels je me suis intéressé, chez l'adulte *C. elegans*. En rouge les cellules gliales des organes chimiosensoriels (amphides pour la tête, phasmides pour la queue). En vert le syncitium hyp7 de l'épiderme majeur. En gris le syncitium seam responsable pour une grande part, de la sécrétion des alae (structures cuticulaires spécifiques des stades L1, dauer et adulte). En jaune la cellule excrétrice qui émet 4 prolongements cytoplasmiques tubulaires (2 vers la tête et 2 vers la queue) qui courent le long de l'animal sous les deux syncitiums seam au contact de l'épiderme hyp7 et du pseudocoelome.

se diviser (Annexe 18). C'est le cas des cellules épithéliales impliquées dans la formation de la vulve qui n'arrive à maturité qu'à l'âge adulte. C'est également vrai pour l'épiderme majeur, dont les cellules se divisent pour permettre la croissance du ver au cours de la vie larvaire. Enfin, les cellules épidermiques de la gonade somatique se divisent jusqu'à ce que celle-ci ait atteint le stade où chaque bras de la gonade bifurque, le relai étant alors pris par des phénomènes de croissance et de morphogenèse pour atteindre la taille finale de cet organe.

3.2.3 La cellule excrétrice.

3.2.3.1 Morphogenèse de la cellule excrétrice et croissance des canaux excréteurs.

Parmi les cellules du lignage épithélial, j'ai travaillé entre-autres sur le système excréteur et principalement sur la cellule excrétrice. C'est une cellule en forme de H qui court sur les flancs de l'animal du bout de la tête à la queue à hauteur du rectum (Figure 38A). Initialement, cette cellule se situe au niveau du deuxième bulbe du pharynx (au niveau du broyeur), et tandis que son corps cellulaire ne migre pratiquement pas, une vacuole interne est formée et des tubes entourés de cytoplasme sont émis à partir de celle-là pour générer 4 prolongements tubulaires appelés canaux excréteurs (Figure 38). Ce processus se déroule à la fin de l'embryogenèse jusqu'au stade L1, et à partir de là, la croissance des tubes se fait de façon concertée avec celle de l'ensemble de l'organisme.

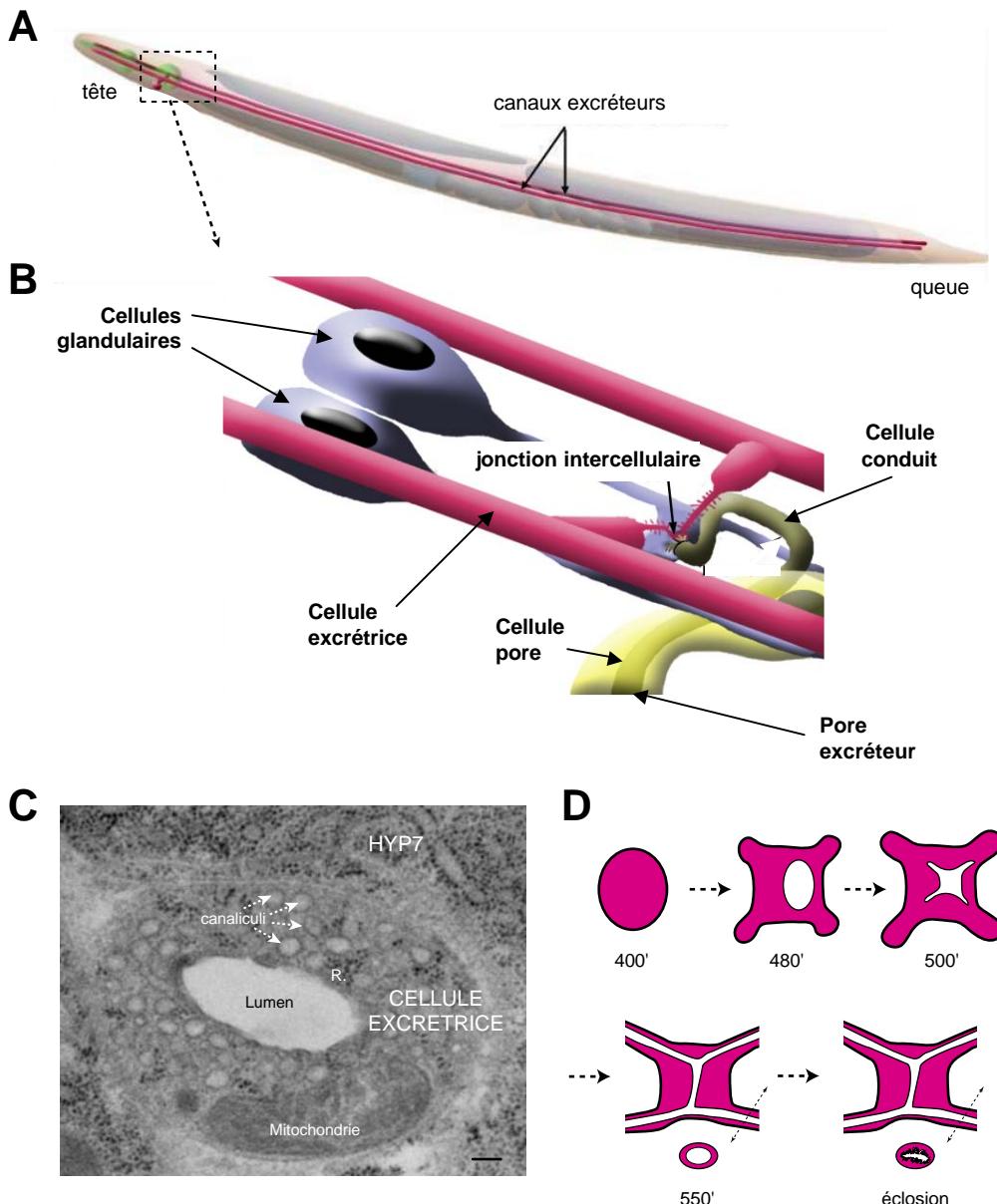
3.2.3.2 Structure des canaux excréteurs.

Pour faciliter les échanges avec le milieu extracellulaire, chaque canal excréteur présente de nombreux canaliculi qui augmentent considérablement la surface de la membrane plasmique apicale comme on peut le voir en microscopie électronique à transmission (Figure 38C). Les canalicules selon l'angle de la section, apparaissent comme des tubules ou des vésicules de 50 à 90 nm. Les mécanismes à l'origine de ses diverticules et de leur régulation ne sont pas connus.

3.2.3.3 Gènes requis pour la morphogenèse des canaux excréteurs.

Un certain nombre de gènes clonés à l'occasion d'un crible pour des défauts de la cellule excrétrice (Figure 39) sont impliqués dans la morphogenèse et le maintien des canaux excréteurs. Ce sont les gènes *exc-1* à -9, *sma-1*, *let-4* et *let-653* (Buechner, Hall et

Figure 38. LE SYSTEME EXCRETEUR DE *C. ELEGANS*



LEGENDE.

A : Schéma de ver adulte. Les canaux excréteurs formés par la cellule excrétrice parcouruent toute la longueur du corps de l'animal de la tête à la queue.

B : Encart sur la région de la tête du ver où se trouvent les corps cellulaires des 5 cellules du système excréteur : cellule excrétrice, 2 cellules glandulaires, cellule conduit et cellule pore. La cellule pore ménage un orifice dans la cuticule, mettant en contact son canal avec le milieu extérieur. La cellule conduit connecte le canal de la cellule pore avec les canaux de la cellule excrétrice. Le rôle des cellules glandulaires n'est pas bien connu, mais il semble qu'il soit critique au moment des mues. Ces cellules sécrèteraient des enzymes permettant le détachement du système excréteur de la vieille cuticule lors des mues.

C : Coupe transversale de canal excréteur chez un adulte. On distingue bien le réseau de canalicules qui occupe la majeure partie du cytoplasme (barre 100 nm).

D : Morphogenèse des canaux excréteurs. A 400' après fécondation, la cellule excrétrice n'a pas de vacuole. Celle-ci apparaît à 480', forme des extensions à partir de 500' qui grandissent jusqu'à 550' et la membrane de la vacuole en H commence à se complexifier un peu avant éclosion (cf. section du canal représentée sous les schémas de la cellule excrétrice).

al. 1999). Ils codent entre autres une protéine de type GEF (EXC-5) (Suzuki, Buechner et al. 2001), un canal de la famille CLIC peut-être impliqué précocement dans la formation des tubes à partir de vacuoles (« Cloride IntraCellular Channel », EXC-4) (Berry, Bulow et al. 2003), une chaîne beta de la spectrine (SMA-1) (McKeown, Praitis et al. 1998) et une mucine (LET-653) (Jones and Baillie 1995) probablement requises pour le maintien du tube, et un facteur de fixation à l'ARN probablement impliqué dans la régulation de l'expression de SMA-1 (EXC-7) .(Fujita, Hawkinson et al. 2003).

3.2.4 Les organes chimiosensoriels.

3.2.4.1 Les neurones des organes chimiosensoriels.

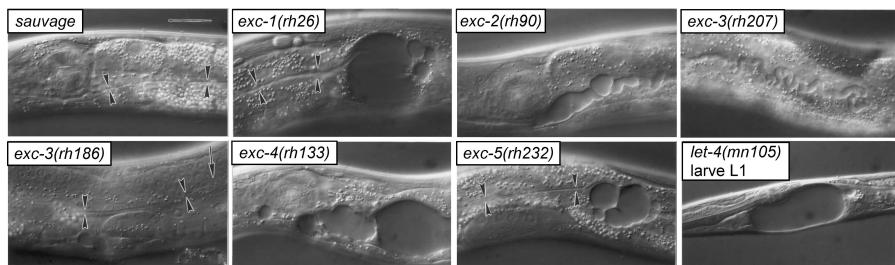
Les organes chimiosensoriels de *C. elegans* sont situés au niveau de la tête pour ceux baptisés amphides et de la queue pour les phasmides. Leur organisation est comparable bien qu'ils impliquent pour les premiers 12 neurones par organe (dont 6 sont marqués par les colorants lipophiles de type Di0 et Dil), et 2 neurones (tous deux marqués par DiO et Dil, un troisième neurone mécanosenseur est présent dans le phasmide gauche) par organe pour les seconds. Ils sont latéralisés et fonctionnent par paire : il existe ainsi deux amphides et deux phasmides. Les fonctions chimiosensorielles des neurones de chaque côté sont seulement partiellement redondantes, et l'on peut distinguer les neurones droits et gauches par l'expression de facteurs de transcriptions, micro-ARN et récepteurs spécifiques (Hobert, Johnston et al. 2002; Johnston and Hobert 2003; Chang, Johnston et al. 2004; Johnston, Chang et al. 2005). Ces neurones sont ciliés et expriment les différents récepteurs et transporteurs ioniques au niveau de ces cils sensoriels. Les corps cellulaires des neurones des amphides se trouvent au niveau du deuxième bulbe du pharynx et forment un collier. Les axones des neurones se rejoignent pour former un faisceau nerveux très étroit au niveau du canal ménagé par les cellules supports.

3.2.4.2 Les cellules support épithéliales des amphides et phasmides.

Les cellules supports sont de deux types : cellules gaines (plus internes) et cellules socles (formant l'extrémité du canal en contact avec le milieu extérieur). Ce sont des cellules allongées dont le corps cellulaire est très distant de leur domaine apical. C'est ce domaine apical qui forme un tube enserrant les neurones ciliés. A ce niveau chaque cellule individuelle est connectée à ses voisines par des jonctions apicales adhérentes qui isolent le

Figure 39. DEFAUTS DE LA CELLULE EXCRETICE DE *C. elegans*.

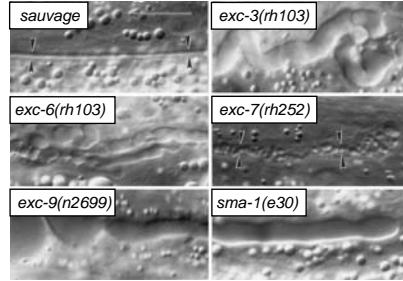
A



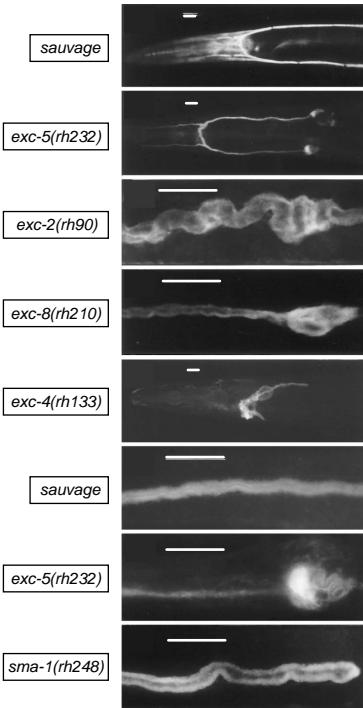
B

Gene	Chr.	Alleles ^a
exc-1	X	rh26
exc-2	X	rh90, rh105, rh209, rh247
exc-3	X	rh196, rh207, rh242, rh251 rh186
exc-4	I	rh133, n561, n2400
exc-5	IV	rh232, rh275, n2672
exc-6	III	rh103
exc-7	II	rh252
exc-8	X	rh210
exc-9	IV	n2669
let-4	X	mn105
let-653	IV	s1733, s2270
sma-1	V	e30, rh248, rh249, rh250

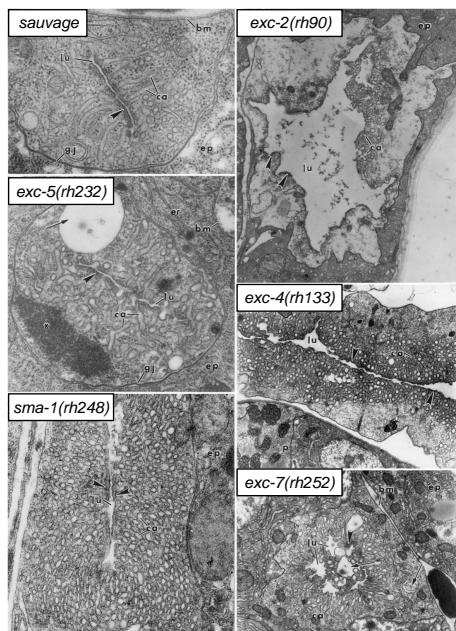
C



D



E



LEGENDE.

A, C : Défauts de forme des canaux chez différents mutants, observés en contraste interférentiel (barres 30 µm).

B : Tableau récapitulatif des allèles et mutants obtenus lors d'un crible pour des défauts de la cellule excrétrice. Les différents mutants ont été obtenu par mutagenèse à l'EMS ("EthylMethane Sulfonate").

D : Défauts des terminaisons des canaux excréteurs chez différents mutants, révélés par du FITC couplé à l'agglutinine de germe de blé (barres 10 µm).

E : Sections transversales en microscopie électronique à transmission de canaux excréteurs de mutants présentant des canaux cystiques (barre 0.5 µm).

canal du milieu extracellulaire. Il existe une cellule gaine et une cellule socle par organe chimiosensoriel (Figure 40).

Plusieurs critères permettent de classer ces cellules (appelées à tort « gliales » par certains) dans les epithelia : elles sont en contact avec le milieu extracellulaire (poche de l'amphide ou du phasmide), possèdent une lame basale qui les maintient en contact avec les cellules hyp et la cavité pseudoceolomique, elles sont polarisées avec une membrane apicale dotée d'une activité sécrétrice, elles sont connectées avec leur cellules voisines par des jonctions apicales, leur développement dépend du gène maître *lin-26*, elles expriment de très nombreux gènes épithéliaux, et comme les autres tissus épithéliaux du ver, elles forment des tubes (Figure 41).

3.2.5 Les deux syncytia de l'épiderme majeur : « hyp7 » et « seam ».

Je me suis particulièrement intéressé à ces deux tissus parce qu'il ont constitué le modèle le plus adapté à l'étude que j'ai réalisée avec Samuel Liégeois, que ce soit pour leur contribution essentielle à la formation de la cuticule , ou leur forme et leur position périphérique qui ont facilité les investigations en microscopie confocale à épifluorescence.

3.2.5.1 Le syncytium hyp7.

Chez l'adulte, ce tissu entoure complètement le ver dans un tube qui le recouvre de la tête à la queue (Figure 41), où d'autres cellules épidermiques closent le tube (hyp 1 à 5 pour la tête et hyp 8 à 11 pour la queue) (Figure 36B). C'est un épithélium polarisé qui entretient des jonctions apicales avec les cellules adjacentes (seam et autres hyp), possède une lame basale qui le sépare des quadrants musculaires et du pseudocœlome, et est au contact des canaux excréteurs (latéralement) et des cordes nerveuses ventrales et dorsales. Il est responsable de plusieurs fonctions comme : la sécrétion de la cuticule, la croissance de l'animale, la défense immunitaire, l'osmorégulation, et permet l'attachement des muscles à la cuticule via les organites fibreux. Son activité sécrétrice intense est attestée par un réticulum endoplasmique granuleux très dense.

C'est un syncytium résultant de la fusion de différentes lignées épidermiques : hyp 6, 7, 12 et 13. Ces fusions interviennent à différentes étapes du développement et impliquent le facteur de fusion EFF-1 (Mohler, Shemer et al. 2002; Shemer, Suissa et al. 2004; del Campo, Opoku-Serebuoh et al. 2005; Kontani and Rothman 2005), et peut-être la V-ATPase

Figure 40. STRUCTURE D'UNE AMPHIDE.

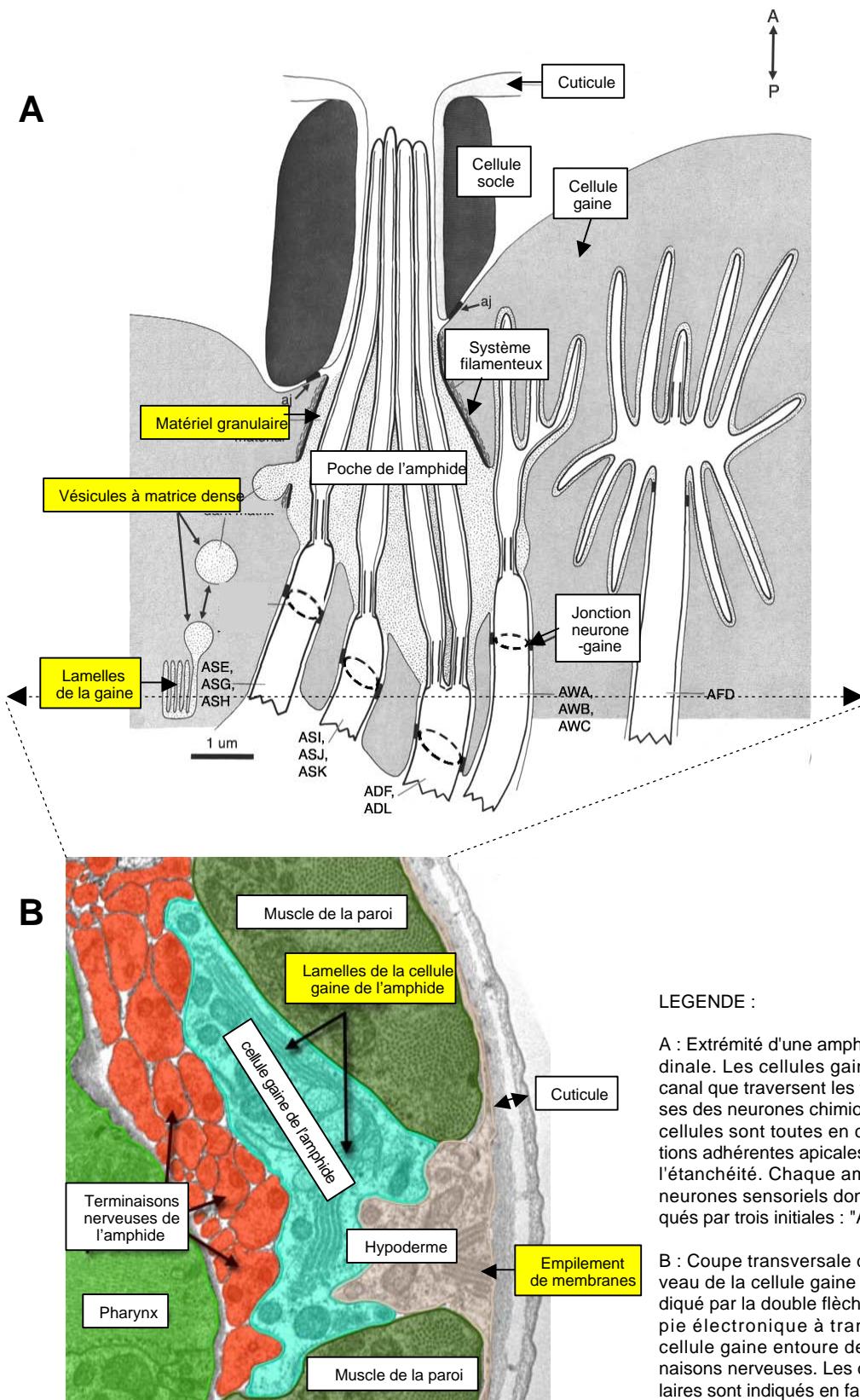
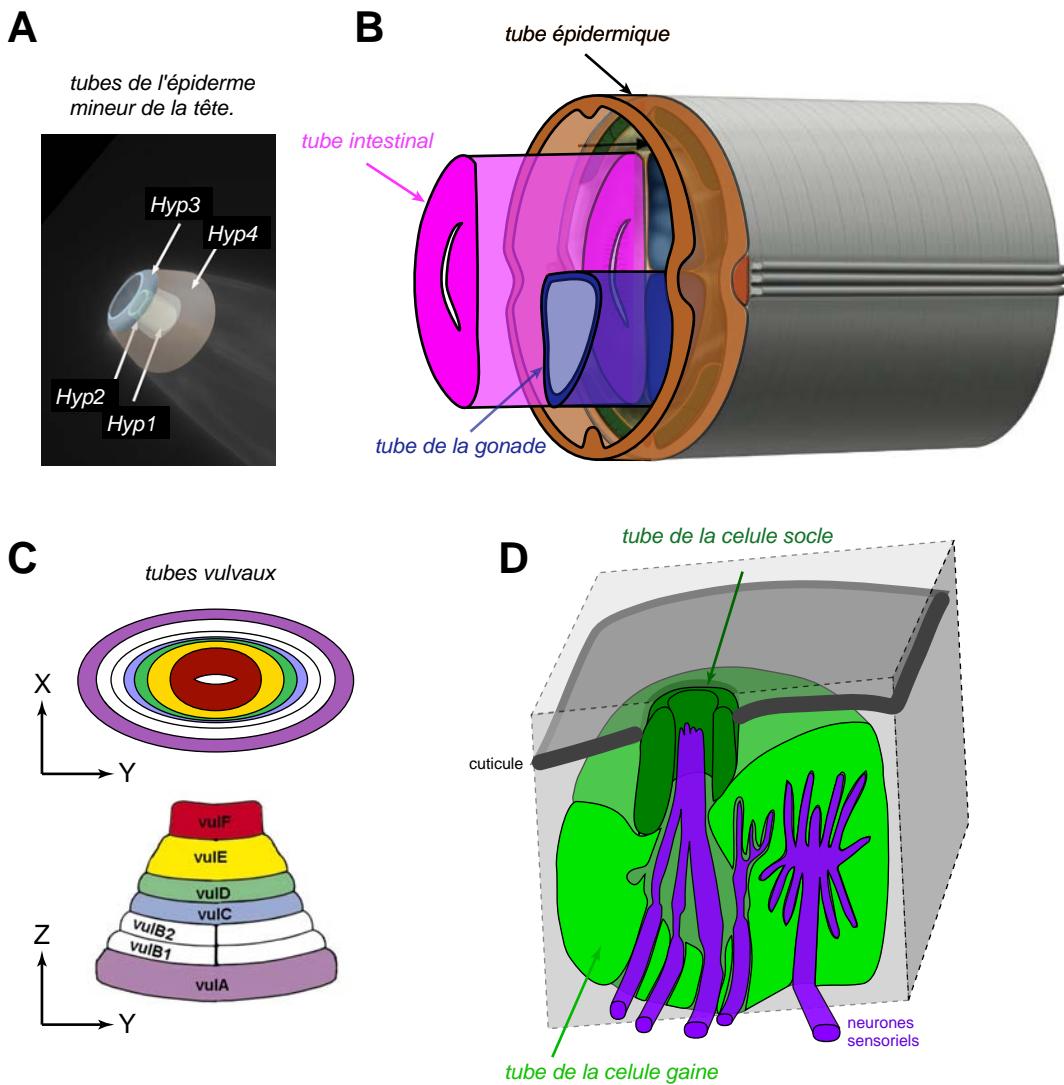


Figure 41. LES TUBES EPITHELIAUX CHEZ *C. elegans*.



LEGENDE.

A : Schéma 3D superposé à une image de fluorescence représentant les 4 tubes épidermiques du nez du ver

B : Coupe transversale de ver adulte. Représentation des 3 principaux tubes épithéliaux longitudinaux : épiderme hyp7, intestin et gonade somatique.

C : Représentation en vue ventrale et latérale des tores qui constituent la partie épithéliale de la vulve. 7 tores empilés sont formés par fusion, et ménagent un orifice de ponte.

D : Représentation d'une section d'organe chimiosensoriel de type amphide. Deux tubes formés par les cellules socle et gaine permettent aux cils des neurones chimiosensoriels de contacter le milieu extérieur.

(Kontani, Moskowitz et al. 2005) (Figure 36A). Le syncytium hyp7 subit des divisions cellulaires jusqu'à l'âge adulte pour permettre la croissance de l'animal.

3.2.5.2 Les cellules « seam ».

Chez l'adulte, les « seam » sont constituées de deux syncytia très fins, formés par deux rangées de cellules : droite et gauche, qui courent à hauteur des canaux excréteurs le long de l'animal, encastrés dans le syncytium hyp7. Ce sont aussi des epithelia polarisés, associés à hyp7 par des jonctions apicales, qui sécrètent apicalement la cuticule (contribuant principalement à la formation de structures appelées alae) et dont la membrane basolatérale jouxte hyp7 et contacte également le canal excréteur le plus proche. Ils possèdent également un réseau dense de REG, ainsi que quelques appareils de Golgi (jusqu'à 5 par section) de plus d'une quinzaine de saccules aisément reconnaissables (Figure 7D). Les syncytia « seam » contrairement à hyp7 ne fusionnent qu'au moment de la mue L4 / adulte. Jusque-là les cellules « seam », à l'instar des noyaux hyp7, se répliquent pour s'adapter à la taille de l'animal.

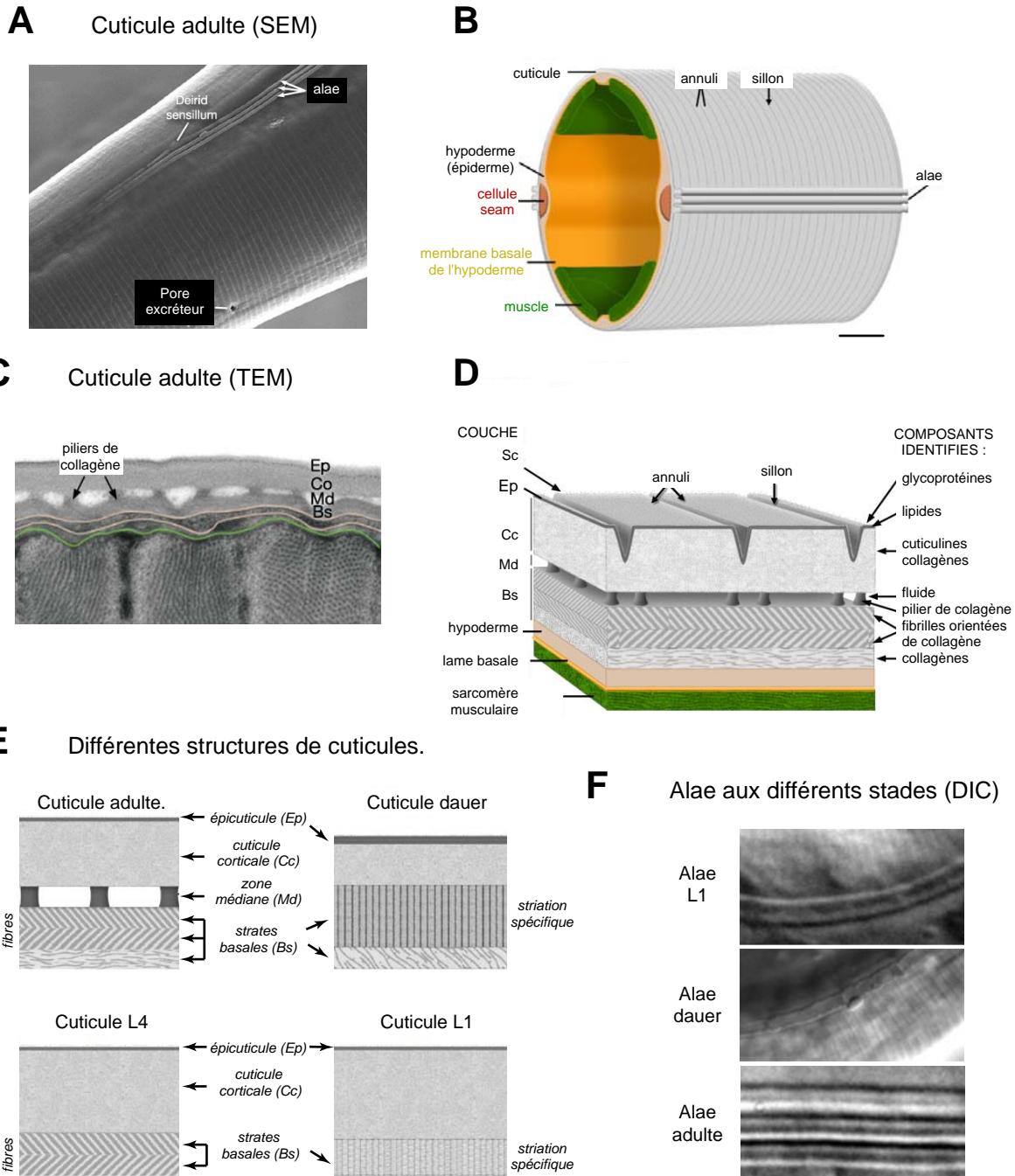
3.3 ***La cuticule de C. elegans***

3.3.1 Morphologie et structure.

D'extérieur la cuticule du ver adulte est une structure souple à l'apparence annelée de par l'existence de sillons et d'annuli circonférentiels (Figures 42A et 42B). D'autre part des structures longitudinales latérales appelées alae forment des espèces de rails triples de par et d'autre de l'animal. La présence et la forme de ces dernières structures dépendent du stade de l'animal. En effet chez les L1 il s'agit de rails doubles, chez les dauers, de rails quadruples ou quintuples, et aux autres stades, les alae sont absentes (Figure 42F).

La cuticule du ver adulte est composée de différentes couches (Figure 42C et 42D) qui diffèrent également selon les stades larvaires (Figure 42E). De la surface vers l'intérieur du ver, on trouve : une épicuticule fine composé de glycoprotéines et lipides, une cuticule corticale plus épaisse composée de cuticulines et collagènes, une zone médiane remplie de fluide et traversée par des piliers de collagène, et une couche stratifiée basale composée de fibrilles de collagènes orientées qui repose sur l'épiderme auquel elle est connectée par des organites fibreux.

Figure 42. COMPOSITION ET ORGANISATION DE LA CUTICULE CHEZ *C. elegans*.



LEGENDE.

A : Cuticule de l'adulte dans la partie postérieure de la tête visualisée par microscopie électronique à balayage (SEM).

B : Représentation d'une section médiane d'un ver adulte. La cuticule adulte est caractérisée par des structures proéminentes longitudinales appelées alae, et des structures circonférentielles formant des anneaux appelés annuli (barre 5 µm).

C : Section transversale de la cuticule adulte en microscopie électronique à transmission (TEM).

D : Représentation d'une coupe longitudinale de la cuticule adulte, composition et stratification.

E : Comparaison de l'organisation stratifiée de la cuticule à différents stades.

F : Image en contraste interférentiel des alae des trois stades pourvus de ces spécialisations: L1, dauer et adulte (barre 5 µm).

3.3.2 Composition.

3.3.2.1 Les collagènes.

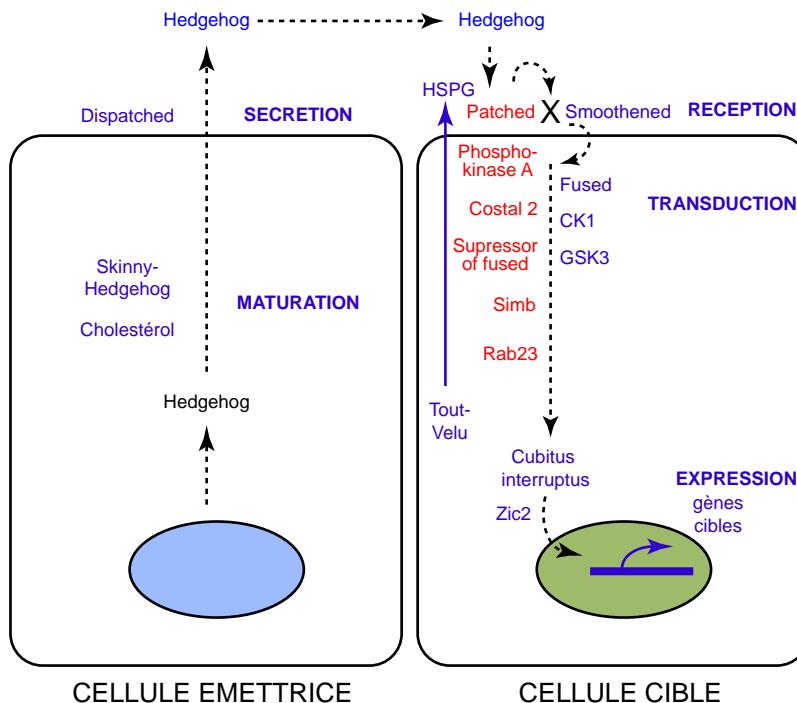
Les collagènes sont des protéines structurales que l'on retrouve dans une grande variété de matrice extracellulaires (MEC) chez les animaux. Ce sont de longues protéines qui s'organisent en fibrilles, formant un entrelacs serré dans la cuticule du ver, dont il constitue la fraction principale. Chaque collagène comporte 57 à 59 répétitions d'un motif Gly-X-Y où X et Y sont deux acides aminés quelconques séparant les glycines (Gly), qui constitue la signature de cette famille de protéines. Les collagènes sont initialement synthétisés sous forme de pré-pro-protéine, nécessitant deux clivages successifs et des modifications post-traductionnelles (hydroxylation des lysines et prolines). Ils s'assemblent en triple hélice, formant des homotrimères ou des hétérotrimères. Cette maturation s'effectue au niveau du Golgi où ils commencent à s'assembler en fibrilles atteignant 300 nm. La taille de ces fibrilles nécessite une voie de sortie du Golgi particulière, impliquant des granules bourgeonnant à partir des dernières citernes précédant le TGN (j'y reviendrai dans la partie III Discussion-Perspectives).

Il existe plus de 175 collagènes exprimés chez *C. elegans* dont certains donnent des phénotypes aisément reconnaissables : Dpy (ver court et épais), Bli (la cuticule forme des ampoules), Rol (les vers tournent sur eux-mêmes car la cuticule est « twistée »), Lon (les vers sont plus longs), Mlt (défaut de mue). Cette diversité est peut-être un moyen de se prémunir contre certains parasites dont les protéases pourraient couper certaines formes mais pas d'autres. D'autre part, les différents collagènes forment des familles dont les fenêtres d'expression temporelle sont différentes, la cuticule est stratifiée et différente selon les stades, ce qui explique aussi en partie cette diversité.

3.3.2.2 Les cuticulines.

Les cuticulines sont des protéines spécifiques de la cuticule des nématodes dont le premier représentant a été identifié chez le ver parasite *Ascaris suum* (Fujimoto and Kanaya 1973; Kanaya and Fujimoto 1973). Ces protéines ont été trouvées chez *C. elegans* ensuite (Sebastiano, Lassandro et al. 1991; Blaxter 1993; Lassandro, Sebastiano et al. 1994; Muriel, Brannan et al. 2003; Sapiro, Hilliard et al. 2005). Elles possèdent des propriétés biochimiques particulières (elles sont notamment insolubles même en conditions très dénaturantes), et forment des liaisons di- et tri-tyrosine avec les autres protéines de la cuticule et entre-elles

Figure 43. SIGNALISATION HEDGEHOG CHEZ LA DROSOPHILE.



LEGENDE.

La signalisation Hedgehog (Hh). Les protéines qui sont activées ou activatrices pour la signalisation Hh sont en bleu, et celles qui sont au contraire inhibitrices ou inhibées sont en rouge.

Hedgehog est synthétisé par la cellule émettrice, où la protéine est modifiée par le cholestérol et l'action de Skinny-Hedgehog qui ajoute un groupement palmitate en N-ter. Puis Hedgehog est transporté hors de la cellule en partie grâce à son "transporteur" Dispatched. Hedgehog reconnu par Patched associé à l'Héparan Sulfate ProtéoGlycan (HSPG), lève l'inhibition de Patched sur Smoothened, qui active la voie de transduction via CK1 et GSK3. La phosphokinase A est inactivée, déstabilisant le complexe Cubitus interruptus (Ci)/Suppressor of fused/Costal2/Fused associé aux microtubules par Rab23. Ci est libéré, n'est plus soumis au clivage par Simb, et devient activateur de la transcription des gènes cibles (alors que sa forme clivée est inhibitrice de cette même transcription) en association avec Zic2. Tout-velu est une enzyme de la biosynthèse de HSPG.

(Fetterer and Rhoads 1993). Sapiro et coll. ont proposé que les cuticulines servent à « tendre » la cuticule au niveau des cellules seam et des alae chez les larves dauer, mais joueraient un autre rôle indéterminé chez l'adulte (Sapiro, Hilliard et al. 2005).

3.3.2.3 Des protéines de type Hedgehog.

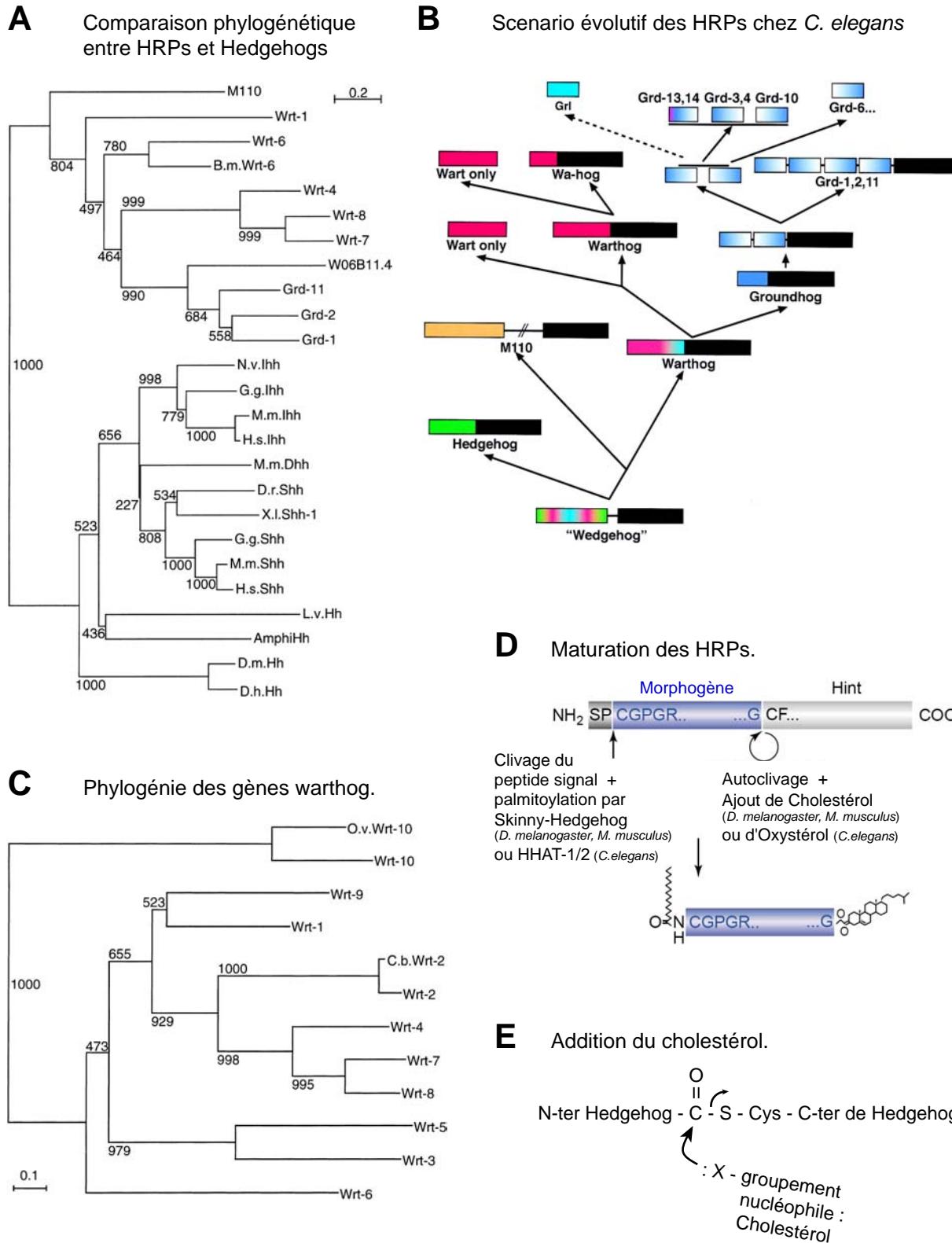
3.3.2.3.1 *La voie Hedgehog en bref (Figure 43).*

La voie Hedgehog est impliquée dans des évènements précoce de détermination de territoires définissant des organes ou des groupes d'organes. Par exemple, le gène *hedgehog* a été initialement découvert chez la drosophile où il est impliqué dans la définition des segments et des territoires de disques imaginaux (Ingham and McMahon 2001). Chez les vertébrés, trois protéines Hedgehog : Sonic-Hedgehog, Indian-Hedgehog et Desert-Hedgehog sont impliquées dans l'organogenèse de différents tissus, et, essentiellement pour Sonic-Hedgehog, dans la mise en place précoce de structures mésodermiques (comme les somites par exemple) et neuroépithéliales (tube neural et dérivés). Hedgehog et ses homologues vertébrés, agissent comme des morphogènes, c'est-à-dire notamment que leur effet dépend de leur concentration. Si l'on prend l'exemple de la détermination du tube neural, le gradient de Sonic-Hedgehog émis à partir de la plaque du plancher (hideuse traduction de « floor plate ») agit comme un signal « ventralisant » qui s'oppose à un gradient de signaux « dorsalisants » (dont BMP4 : « Bone Morphogenetic Protein 4 »). Le mode d'action de Hedgehog (Hh) passe par la levée d'inhibition de son récepteur Patched (Ptc) sur Smoothened (Smo). La fixation de Hh sur Ptc abolit l'interaction Ptc-Smo, déclenchant l'internalisation de Ptc, et la libération de Smo, ce qui permet la transduction du signal au niveau intracellulaire, aboutissant à l'expression de gènes cibles impliqués dans la détermination ou la différenciation de progéniteurs de divers types cellulaires (Ingham and McMahon 2001; Cohen 2003).

3.3.2.3.2 *La signalisation Hedgehog chez C. elegans.*

Chez *C. elegans*, la voie Hedgehog telle qu'elle est décrite chez la drosophile ou les vertébrés n'a pas lieu d'être. Le ver ne possède en effet ni métamères, ni membres, ni tube neural, etc. de fait un certain nombre de gènes de la voie décrite dans les autres organismes est absent. En particulier, dans la voie de transduction du signal, seul *tra-1* correspondant aux facteurs de transcription Ci (« Cubitus interruptus ») chez la Drosophile et Gli (« Gli ») chez les vertébrés, est conservé et son rôle est restreint à la détermination du sexe. Ni Smo, ni aucun des autres acteurs de la voie de transduction Smo ne sont conservés. En revanche, des enzymes de la voie de biosynthèse (HHAT-1 et -2 : « hedgehog acetyl transferase 1 et

Figure 44. LES PROTEINES DE TYPE HEDGEHOG CHEZ C.ELEGANS



(A, B, C : d'après Aspöck et coll. Gen. Res. Vol. 9, Issue 10, 909-923, October 1999,
D : d'après Kuwabara et Labouesse. Trends Genet. 2002 Apr;18(4):193-201
E : d'après Porter, J. A., S. C. Ekker, et al. (1996). Cell 86(1): 21-34.)

2»), les récepteurs LRP1/mégaline, RIB-1/-2 (orthologues de EXT1 et EXT2 pour « Exostose Type I protein »), les récepteurs de la famille de Patched : PTC (« PaTChed genes » et PTR « PaTched-Related genes ») ainsi que les transporteurs de type Dispatched/Disp1 comme CHE-14 (« CHEmosensation-defective 14 ») sont conservés.

De plus les protéines de la famille Hedgehog (HRPs pour « Hedgehog Related Proteins ») et les récepteurs de type PTC/PTR ont subit une expansion considérable chez les nématodes avec 62 membres pour les premiers (WRT-1 à -10, GRD-1 à -17, GRL-1 à -32, QUA-1, HOG-1) (Figure 44) et 27 pour les seconds (PTC-1 à -3 et PTR-1 à 24).

Différentes fonctions ont été attribuées aux HRPs et à leurs récepteurs putatifs : rôle dans l'organisation des structures cuticulaires comme les alae (Zugasti, Rajan et al. 2005), dans la morphogenèse et le fonctionnement des cellules support des organes chimiosensoriels (Michaux, Gansmuller et al. 2000; Incardona 2005; Perens and Shaham 2005)(wrt-6 données non publiées), dans le développement de l'épiderme (Hao, Aspock et al. 2006), dans la mue (Hao, Mukherjee et al. 2006), dans la division cellulaire (Kuwabara, Lee et al. 2000). Cependant on ne sait pas encore comment ces protéines agissent, si elles constituent des signaux, des déterminants structuraux, etc.

3.3.2.3.3 Les protéines de type *Hedgehog* et la cuticule.

Parmi les phénotypes associés à des ARNi (souvent multiples, les ARNi simples donnant rarement des phénotypes très fort) ou des mutations des HRPs, des défauts cuticulaires (défauts d'alaе, de mue, ampoules) sont très fréquemment observés et en effet beaucoup de gènes codant pour ces protéines sont exprimés dans l'épiderme (Aspock, Kagoshima et al. 1999; Zugasti, Rajan et al. 2005; Hao, Aspock et al. 2006; Hao, Mukherjee et al. 2006). Le fait que les récepteurs putatifs PTCs et PTRs (Zugasti, Rajan et al. 2005) donnent le même type de défauts, et que le transporteur putatif CHE-14 également (Michaux, Gansmuller et al. 2000), renforce l'impression que ce qui reste de la voie Hedgehog chez *C. elegans* est étroitement lié au fonctionnement de l'épiderme et à l'architecture de la cuticule. Jusqu'à présent, il a été montré que CHE-14 serait requis pour la sécrétion de certains constituants de la cuticule (Michaux, Gansmuller et al. 2000) et que la protéine QUA-1 est un constituant de la cuticule (Hao, Mukherjee et al. 2006).

3.3.3 Fonctions de la cuticule.

3.3.3.1 La cuticule, squelette externe du ver.

3.3.3.1.1 Un corset qui définit la forme du ver.

La première cuticule est secrétée dans l'œuf juste avant éclosion. A ce stade, c'est davantage l'épiderme dont la forme est contrainte par son cytosquelette (actine et filaments intermédiaires ancrés sur les jonctions apicales et les organites fibreux) qui définit la forme de la cuticule L1 qu'il sécrète. Cependant la contribution ultérieure de la cuticule dans le maintien de la forme du ver est révélée en contexte mutant pour certains collagènes. En effet, l'absence ou les dominant-négatifs de collagènes du type *dpy*- (phénotype Dpy, pour « dumpy » : râblais) un raccourcissement et un arrondissement du ver dont on peut voir par transparence les organes comprimés dans le sens de la longueur (intestin et gonades tortillés, pharynx plié etc.). Plus impressionnant, certains mutants de collagènes (*rol-6* par exemple) entraînent un phénotype Rol (pour « roller » : tourneur), qui constraint le ver à tourner sur lui-même dans un sens déterminé. Lorsque l'on regarde la cuticule, on constate que les alae au lieu d'être rectilignes, sont spiralées comme les génératrices d'une hélice. Et non seulement toute la cuticule, mais les organes internes du ver (gonades incluses) adoptent cette organisation spiralée, y compris les muscles locomoteurs dont les contractions induisent alors un mouvement tournant du ver lorsqu'il essaye de se déplacer. Comme ce phénotype est aisément reconnaissable et n'est pas invalidant dans les conditions de vie au laboratoire, on utilise classiquement un dominant-négatif *rol-6(su1006dm)* comme marqueur de sélection pour la transgénèse (cf. chapitre II matériel et méthodes articles 1 et 2).

3.3.3.1.2 *La cuticule, support des muscles locomoteurs.*

Si les déformations de la cuticule sont transmises à l'ensemble des tissus du ver comme le révèle le phénotype Rol, c'est que la cuticule est solidaire de l'épiderme et des muscles grâce à des structures complexes appelés organites fibreux (qui sont les équivalents des hémidesmosomes des vertébrés) situés au niveau où l'épiderme est le plus mince : au-dessus des quadrants musculaires.

3.3.3.2 Une barrière physico-chimique et immunologique.

La cuticule constitue également pour le ver une protection physique contre les blessures, et chimique de par sa quasi-étanchéité. Ainsi *C. elegans* survit plusieurs minutes voir quelques heures dans un fixateur comme le paraformaldéhyde à 2,5%, et tolère également des pHs de 1 à 13. La cuticule protège aussi le ver contre les microorganismes pathogènes. On peut supposer que la cuticule contient des facteurs antimicrobiens (Mendoza De Gives, Davies et al. 1999). L'infection par les bactéries comme *Serratia* passe ainsi par l'intestin (les bactéries ne sont pas capables de l'infecter via sa cuticule) ou le rectum (Hodgkin, Kuwabara et al. 2000), et les champignons comme *Drechmeria*

coniospora, bien que capables de percer la cuticule, infectent l'animal par les orifices buccal, anal et vulvaire. D'autre part les mutants plus sensibles à l'infection ont une cuticule anormale (Gravato-Nobre, Nicholas et al. 2005).

3.3.4 Une sécrétion cyclique de la cuticule.

C. elegans sécrète 5 fois sa cuticule car il subit 4 mues. A chaque mue se produisent la dégradation de l'ancienne cuticule et la sécrétion d'une nouvelle cuticule. Les deux processus impliquent l'expression séquentielle et transitoire de nombreux gènes. Il existe une « horloge biologique » qui orchestre le développement larvaire et la mue chez *C. elegans* (Ambros 1989). Ces gènes hétérochroniques contrôlent l'expression de différentes cibles parmi lesquelles des protéases (Davis, Birnie et al. 2004), des enzymes nécessaires à la synthèse de composants cuticulaires, des composants de la matrice extracellulaire, des protéines impliquées dans des signalisations encore méconnues (Frands, Russel et al. 2005), des collagènes (Johnstone and Barry 1996) dont les différentes familles ne sont pas sécrétées au même moment de la mue, ou sont sécrétées lors de mues différentes. Bien qu'aucun ligand hormonal n'ait été identifié jusqu'à maintenant, les orthologues des récepteurs nucléaires sont impliqués dans la régulation des mues (Kostrouchova, Krause et al. 2001). De façon intéressante l'horloge qui pilote les mues peut être découpée de celle contrôlant le développement (divisions cellulaires/différenciations), par l'activation des récepteurs nicotiniques (Ruaud and Bessereau 2006).

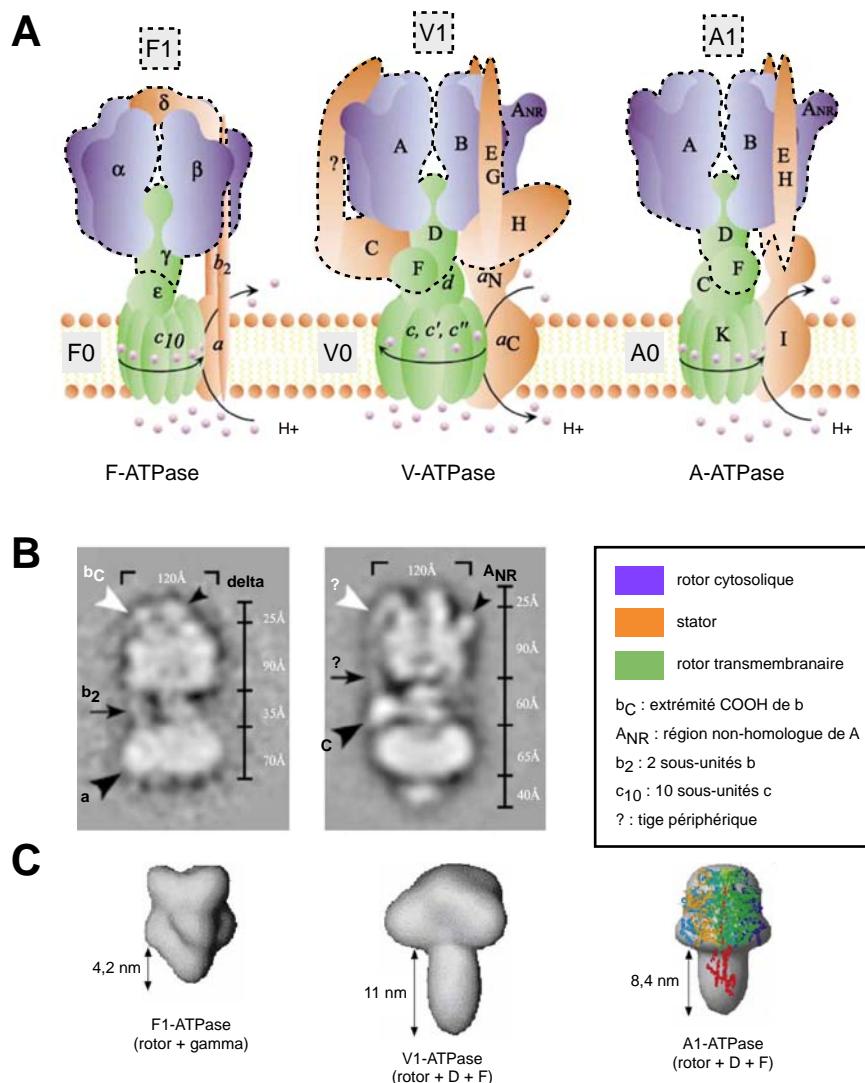
4 L'ATPase vacuolaire à protons, un complexe protéique essentiel des eucaryotes.

4.1 Fonctionnement de l'ATPase vacuolaire.

4.1.1 Généralités sur les ATPases.

Pour survivre et assurer le maintien d'un métabolisme cellulaire performant, les cellules doivent réaliser en permanence des échanges ioniques avec leur environnement destinés à maintenir l'homéostasie. L'essentiel de ces échanges ioniques repose sur le fonctionnement de pompes établissant des gradients de concentrations ioniques qui sont à leur tour utilisés par des échangeurs d'ions pour maintenir la balance osmotique propice au métabolisme cellulaire. Parmi ces pompes, la superfamille des pompes ATPases est la première impliquée et se décompose quatre catégories dont on retrouve des membres chez les procaryotes et les eucaryotes : les ATPases de type A, F, P et V. Les A-ATPases seraient le type ancestral de la famille des A, F et V-ATPases. On les retrouve beaucoup chez les archaebactéries (Nelson 1989; Nelson and Taiz 1989; Wilkens 2005). Les F-ATPases et certaines A-ATPases sont des ATP synthétases et non des ATP hydrolases, qui utilisent le gradient de protons créé par exemple par la chaîne respiratoire (dans les mitochondries) ou photosynthétique (dans les chloroplastes) pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Annexes 2 et 4). Les P-ATPases (Na^+/K^+ - et H^+/K^+ -ATPases...) en revanche hydrolysent l'ATP et utilisent l'énergie libérée pour transporter des ions souvent contre leur gradient de concentration et on en retrouve essentiellement à la membrane plasmique (Jaisser 1996). L'ancien paradigme voulait que les gradients de sodium soit les forces osmotiques prépondérantes dans les cellules, mettant en avant les P-ATPases à sodium comme complexes clefs de l'osmorégulation cellulaire. Depuis, le nouveau paradigme veut que ce soit les échanges de protons qui décident de la donne, et le rôle de premier plan anciennement dévolu à ces P-ATPases revient désormais aux V-ATPases à protons (Harvey and Wieczorek 1997). Les V-ATPases possèdent une structure modulaire (cf. point suivant) analogue à celle des F-ATPases (Figure 45), mais pour réaliser le processus inverse : elles se servent de l'énergie d'hydrolyse de l'ATP (à l'instar des P-ATPases) pour créer des gradients de protons le plus souvent (H^+ -V-ATPase des eucaryotes, l'objet de ce chapitre), mais aussi de sodium (Na^+ -V-ATPase d'*Enterococcus*

Figure 45. STRUCTURES DES F- / V- / A- ATPASES



A : Schémas des trois types d'ATPases à protons. Les ATPases à protons présentent toutes une structure modulaire avec deux sous-complexes (X0 transmembranaire et X1 cytosolique). Par ailleurs, chacun de ces secteurs possède une partie capable de tourner appelée rotor. Les rotors de chaque sous-complexe sont couplés et maintenus associés par les sous-unités des stators. Le sens de rotation dépend de l'activité ATPase ou ATP synthase de la pompe.

B : Visualisation en microscopie électronique de la F- (gauche) et de la V-ATPase (droite).

C : Reconstitution 3D de la structure des secteurs cytosoliques des trois types d'ATPases à protons.

hirae, (Kakinuma, Kakinuma et al. 1993; Murata, Takase et al. 1999; Murata, Yamato et al. 2005) ou de calcium (Cunningham and Fink 1994). On pensait initialement que ce type d'ATPase était une exclusivité des eucaryotes, puis d'un « super-empire » archae / eucaryotes (Nelson 1989; Nelson and Taiz 1989), avant d'en découvrir chez des eubactéries ((Gogarten, Starke et al. 1992; Hilario and Gogarten 1998; Radax, Sigurdsson et al. 1998; Murata, Takase et al. 1999) revue récente par (Lolkema, Chaban et al. 2003)) chez qui elles auraient été acquises par transfert horizontal à partir d'archéobactéries (Hilario and Gogarten 1993; Hilario and Gogarten 1998). Ainsi, on les trouve à la membrane cytoplasmique de procaryotes extrémophiles comme l'eubactérie *E. hirae* qui vit dans des environnements très alcalins et de forte teneur en sel (Kakinuma, Kakinuma et al. 1993), comme les eubactéries affiliées au genre *Thermus* (Tsutsumi, Denda et al. 1991) ou encore comme les archaebactéries telles *Methanococcus* ((Bult, White et al. 1996), *Methanosarcina*, *Haloferax* et *Halobacterium* (Steinert, Kroth-Pancic et al. 1995; Ihara, Watanabe et al. 1997), *Thermococcus* (Iida, Kanai et al. 1997), *Pyrococcus horikoshii* (Lokanath, Ukita et al. 2005), mais on les trouve surtout chez tous les eucaryotes, virtuellement dans tous les compartiments cytoplasmiques et à la membrane plasmique (Harvey and Wieczorek 1997; Kane 2006).

4.1.2 Structure de l'ATPase vacuolaire à protons (H+-V-ATPase) (Figure 45).

La H+- V-ATPase (Adénosine-TriPhosphate hydrolase Vacuolaire à protons) est un très gros complexe protéique des eucaryotes, de 14 types de sous-unités (a, c, c', c'', d, e, A, B, C, D, E, F, G, H), et d'un poids moléculaire total d'environ 900 kDa (le nombre de sous unités E et G que l'on compte pour le secteur V1 n'étant pas consensuel, (Ohira, Smardon et al. 2006)) et est composées de deux secteurs dissociables dénommés V0 (secteur transmembranaire : a, c, c', c'', d, e) et V1 (secteur cytosolique : A, B, C, D, E, F, G, H). La structure des V-ATPases a été plus ou moins complètement élucidée chez différents organismes : *Enterococcus hirae* (Kakinuma, Yamato et al. 1999; Murata, Yamato et al. 2005), *Saccharomyces cerevisiae* (Kane and Smardon 2003; Kane 2006), *Neurospora crassa* (Margolles-Clark, Tenney et al. 1999), *Manduca sexta* (Wieczorek, Grber et al. 2000; Wieczorek, Huss et al. 2003), *Bos taurus* (Arata, Nishi et al. 2002; Inoue, Wilkens et al. 2003; Wilkens, Zhang et al. 2005), Après avoir établi que la structure des complexes V-ATPases était remarquablement conservé, des études phylogénétiques et génétiques ont permis d'étendre ce modèle à d'autres organismes possédant au moins génétiquement les mêmes types de sous-unités dont *C. elegans* (Oka, Yamamoto et al. 1997; Oka, Yamamoto et al.

1998; Oka and Futai 2000; Oka, Toyomura et al. 2001; Choi, Ji et al. 2003; Ji, Choi et al. 2006). L'utilisation combinée de techniques de génétique, de biophysique, de biochimie et de la microscopie électronique a permis d'établir une topologie quasi-consensuelle de l'archétype de la V-ATPase (Wilkens, Zhang et al. 2005). L'ensemble de ces études pour élucider la structure de la V-ATPase s'est largement appuyé sur les informations et l'expertise acquises sur son analogue mieux connu : la F-ATPase.

4.1.2.1 Composition du secteur cytosolique V1.

Le secteur V1 est composé de 12 ou peut-être 14 sous-unités (Ohira, Smardon et al. 2006) de 8 types différents (Figures 45 et 46) : 3 sous unités « A » (3 x 66,7 kDa chez *C.elegans*), 3 sous-unités « B » (3 x 54,6 kDa chez *C.elegans*), une sous-unité « C » (43,4 kDa chez *C.elegans*), une sous-unité « D » (28,8 kDa chez *C.elegans*), une ou deux sous-unité(s) « E » (25 kDa chez *C.elegans*), une sous-unité « F » (13,3 kDa chez *C.elegans*), une ou deux sous-unité(s) « G » (14,6 kDa chez *C.elegans*), une sous-unité « H » (54,2 kDa chez *C.elegans*). Chez les autres eucaryotes, la taille des sous-unités peut varier sensiblement mais la composition du secteur V1 reste identique (Figure 46).

4.1.2.2 Composition du secteur cytosolique V0.

Le secteur V0 est composé de 9 sous unités intégrales de 6 types différents (Figure 46) : 4 sous-unités « c » (Arai, Terres et al. 1988) (4 x 16,9 kDa chez *C.elegans*), une sous-unité « c' » (16,4 kDa chez *C.elegans*), une ou deux sous-unité(s) « c" » (23 kDa chez *C.elegans*), formant le rotor protéolipidique (Powell, Graham et al. 2000), une sous-unité « a » (99,3 kDa chez *C.elegans*), et une sous-unité « d » (39,9 kDa chez *C.elegans*). Il contient aussi parfois des sous-unités régulatrices comme la sous-unité « e » aussi appelée « M9.7 » (9,7 kDa, encodée par *fus-1* chez *C.elegans*) (Sambade and Kane 2004) ou Vma9p chez la levure (Compton, Graham et al. 2006), ou comme Ac45/S1 (Supek, Supekova et al. 1994). Encore une fois, chez les différents eucaryotes, la taille des sous-unités peut varier sensiblement (Figure 46). A noter aussi, la V-ATPase à sodium de *E. hirae*, présente une différence par rapport au modèle classique des V-ATPases avec un rotor heptamérique (Murata, Arechaga et al. 2003).

4.1.3 Assemblage du complexe V-ATPase.

Figure 46. SOUS-UNITES DE V-ATPASE CHEZ DIFFERENTS ORGANISMES.

Organisme		<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. elegans</i>		<i>P. falciparum</i>		<i>M. musculus</i>	<i>P. caudatum</i>
secteur	sous-unité	nom	taille (kD)	nom	taille (kD)	nom	taille (kD)	nom	nombre
V1	A	VMA 1	69	VHA-13	66,7	PF13 0065	71,8	A1 / A2	4
	B	VMA 2	57	VHA-12/ SPE-5	54,6	PFD0305c	55,7	B1 / B2	4
	C	VMA 5	42	VHA-11	43,4	PFA 0300c	45,2	C1 / C2a / C2b	1
	D	VMA 8	32	VHA-14	28,8	PF13 0227	31,1	D1 / D2	1
	E	VMA 4	27	VHA-8	25	PF11670c	28,9	E1 / E2	4
	F	VMA 7	14	VHA-9	13,3	PF11 0412	16,2	F	2
	G	VMA 10	13	VHA-10	14,6	PF13 0030	14,2	G1 / G2 / G3	ND
	H	VMA 13	54	VHA-15	54,2	PF13 0034	53,8	H	4
V0	a	VPH 1 / STV 1	95	UNC-32 / VHA-5 / VHA-6 / VHA-7	99,3	PF08 0113	122,9	a1 / a2 / a3 / a4	17
	d	VMA 6	36	VHA-16	39,9	PF14 0615	47,8	d1 / d2	3
	c	VMA 3	17	VHA-1 / VHA-2 / VHA-3	16,4 / 16,9	PFE0965c	17	ATP6V0c	6
	c'	VMA 11	17	NO	NO	NO	NO	NO	0
	c"	VMA 16	23	VHA-4	23	MAL13P 1.271	22,1	ATP6V0f	0
	e	VMA 9	9,7	FUS-1	9,7	ND	ND	ND	2
Ac45 or S1		NO	NO	Y55H10A.1	49,6 / 27 *	ND	ND	ATP6S1 / C7-1	ND

* Le premier nombre indique la taille du précurseur et le second celle de la protéine finale

LEGENDE.

Les différents organismes présentent grossièrement la même organisation de V-ATPase et les mêmes sous-unités de la levure à la souris. Cependant la levure est la seule (avec les autres mycètes) à posséder une sous-unité c', et parmi les mycètes elle n'est pas représentative avec ces deux sous-unités a (les autres mycètes n'en ont qu'une, de type VPH1). La paramécie elle se distingue par ses nombreuses isoformes de sous-unités a, c, A, B, E et H. À l'inverse l'hématzoaire *P. falciparum* ne présente pas de sous-unités redondantes. La redondance des sous-unités a et/ou c du secteur V0 semble être un trait commun des autres organismes. *C. elegans* ne présente de redondance que pour les sous-unités a, c et B.

4.1.3.1 Synthèse des sous-unités.

Les sous-unités de la V-ATPase sont synthétisées pour le secteur V0 au niveau du REG, et pour le secteur V1 au niveau de polysomes cytosoliques. Peu de choses est connu sur le repliement et la maturation des différentes sous-unités. On sait cependant que la sous-unité « A » chez la levure, subit un clivage autocatalytique après traduction, pour exciser une intéine (Kane, Yamashiro et al. 1990). La sous-unité « Ac45 » subit également de remaniements post-traductionnels. Chez le xénope, un polypeptide de 48 kD est ainsi traduit, puis glycolysé pour atteindre 60 kD, avant d'être clivé, aboutissant à une protéine mature glycosylée de 40 kD (Holthuis, Jansen et al. 1999).

4.1.3.2 Assemblage de V0.

Le secteur transmembranaire V0 vu en microscopie électronique forme une rosette hexamérique composée des protéolipides très hydrophobes 4x « c », 1x « c' » et 1x « c" » associée à une structure transmembranaire qui s'étend du côté cytosolique et formée par « a » et « d ». Cette structure ménage un canal présentant deux petites ouvertures côté lumenal et une seule plus large côté cytoplasmique (Wilkens and Forgac 2001). Cette organisation a été confirmée chez les plantes (Kluge, Seidel et al. 2004). La sous-unité « a » semble centrale dans l'organisation du complexe V0 et s'associe avec les domaines transmembranaires de « c » (Kawasaki-Nishi, Nishi et al. 2003) et « c" » (Wang, Inoue et al. 2004). La partie C-terminale de la sous-unité « c » serait du côté de la lumière, alors que celle de « c" » serait cytoplasmique (Nishi, Kawasaki-Nishi et al. 2001).

L'assemblage du secteur V0 de la V-ATPase a lieu au niveau du RE (Graham, Flannery et al. 2003). Chez la levure, il requiert les protéines résidentes du RE Vma21p (Hill and Stevens 1994; Malkus, Graham et al. 2004), Vma12p (Bachhawat, Manolson et al. 1993; Hirata, Umemoto et al. 1993) et Vma22p (Hill and Stevens 1995). De plus, il a été récemment montré que la sous-unité « e » (Sambade and Kane 2004) est requise à cette étape, et qu'inversement toutes les autres sous-unités de V0 sont requises pour que « e » puisse quitter le RE et atteindre la vacuole (Compton, Graham et al. 2006), suggérant que la sortie de V0 du RE, au moins chez la levure, requiert un assemblage correct de toutes ses sous-unités. Cependant, il a aussi été montré que des complexes V1 – sous-unité « a » pouvaient quitter le RE et s'associer ultérieurement aux protéolipides pour compléter le secteur V0, indiquant qu'à la fois la sous-unité « a » et les protéolipides peuvent atteindre le Golgi sans être associés à un secteur V0 complet (Kane, Tarsio et al. 1999).

4.1.3.3 Assemblage de V1.

Le secteur V1 est également composé de sous-unités statiques (stator : « C, E, G, H ») et mobiles (rotor : « A, B, D et F »). L'organisation et la composition de V1 sont actuellement connues, mais son assemblage l'est moins. On commence cependant à avoir une idée plus précise des interactions qui permettent celui-ci. Ainsi, un fragment aminoterminal de 78 nucléotides de la sous-unité « E » lie la sous-unité H en double-hybride et est requis *in vivo* pour l'activité de la V-ATPase (Lu, Vergara et al. 2002). La sous-unité « E » interagit également avec la sous-unité « A », au moins lorsque « A » est liée à son ligand (Kawamura, Arakawa et al. 2001). Des travaux récents indiquent ensuite que le complexe « E-G-C » se forme probablement à partir du complexe « E-C » (Fethiere, Venzke et al. 2005). La mutagenèse des sites putatifs d'interaction de sous-unités de V1, suivie de co-immunoprecipitations (CoIP) des complexes formés avec les sous-unités mutantes, ont permis de mieux définir les résidus essentiels aux interactions et la nature de celles-ci. Ainsi la sous-unité « E » n'est pas essentielle à l'association de complexes « B - C » inactifs avec le secteur V0, indiquant que la sous-unité « C » peut interagir avec d'autres sous-unités de la V-ATPase. D'autre part la sous-unité « E » possède deux domaines de liaison à « G » et l'un de ces domaines permet des interactions électrostatiques (Jones, Durose et al. 2005). L'association « E – G » est essentielle à la mise en place du stator V1 qui relie les secteurs V1 et V0 {Fethiere, 2004 #733}.

4.1.3.4 Assemblage du complexe V1 – V0.

Il a été initialement montré que deux modes d'assemblages peuvent exister : un pré-assemblage indépendant des deux complexes, suivi d'une association ultérieure entre des secteurs V0 et V1 complets, ou bien un assemblage progressif de l'ensemble du complexe au niveau du RE, avec des intermédiaires qui peuvent ne contenir qu'une partie des sous-unités de V0 et de V1 {Kane, 1999 #1109}. Alternativement, ces données pourraient signifier qu'après assemblage de complexes complets V0 et V1, certaines sous-unités pourraient se dissocier du complexe V-ATPase. Il a par ailleurs été montré que V1 et V0 ne sont pas transportés par les mêmes machineries dans les axones de neurones géants de torpille (Morel, Gerard et al. 1998).

Les données topologiques et biochimiques obtenues sur la V-ATPase ont permis d'identifier les sous-unités qui permettent l'assemblage des deux secteurs : « a », « d », « B », « C », « E », « G ». Plus précisément, l'assemblage de V0 et V1 requiert absolument le domaine N-terminal de la sous-unité « a » (Kawasaki-Nishi, Bowers et al. 2001), et les sous-unités « E » et « G » (Fethiere, Venzke et al. 2004). La stabilité du complexe dépend cependant également des sous-unités « A » (Liu, Leng et al. 1997) et « B » (Liu, Kane et al.

1996) dont certaines mutations peuvent conduire à une déstabilisation ou à un découplage des activités de V0 et V1. La sous-unité « C » est aussi essentielle à l'association des deux sous-complexes (Gruber 2005). Enfin, via les régulations que l'on verra plus loin (cf. 4.3), l'association V1-V0 dépend d'autres facteurs capables de se lier à différentes sous-unités V0 ou V1 du complexe, comme l'aldolase qui interagit avec « a », « E » et « B » (Lu, Sautin et al. 2004), Ac45, ou le complexe RAVE.

4.1.4 L'association fonctionnelle complémentaire de V1 et de V0 : comment coupler l'hydrolyse de l'ATP au transport de protons.

La V-ATPase est avant tout une pompe qui consomme de l'ATP et utilise l'énergie de son hydrolyse pour transporter des protons d'un côté à l'autre d'une bicouche lipidique. C'est le couplage entre les sous-complexes V1 et V0 remplissant chacun l'une de ces 2 fonctions (ATPase pour V1 et translocation de protons pour V0) qui permet l'activité de la pompe.

4.1.4.1 Bref rappel sur les conversions énergétiques dans les cellules.

Les énergies manipulées par les cellules et leurs machineries ARN ou protéiques, sont d'origines diverses : réactions d'oxydoréduction, hydrolyses, différentiels de concentrations ioniques, de pression osmotique, lumière, chaleur, pressions et tensions physiques de différentes sources etc. Dans l'environnement cependant, la disponibilité de chaque source énergétique étant fluctuante, les cellules ont sélectionné des mécanismes de conversion de formes d'énergies en d'autres (rôle des pompes, transporteurs, cytochromes, photorécepteurs...), et des systèmes d'échange et de stockage énergétique (ATP, NADPHH+, oses phosphatés, polyholosides, triglycérides, compartiments de stockage d'ions en grande concentration comme le réticulum sarcoplasmique, l'espace intermembranaire mitochondrial etc.). Par exemple, la mitochondrie dont on a parlé dans le chapitre 1, grâce aux cytochromes de la chaîne respiratoire, convertit l'énergie d'oxydoréduction en un gradient de protons qui est ensuite converti par la F-ATPase en ATP, considérée comme la « petite monnaie énergétique de la cellule » (expression du physiologiste hongrois Szent-Györgyi). Ainsi, la plupart des enzymes cellulaires utilisent l'hydrolyse de composés organiques, principalement des nucléosides triphosphates (ATP ou GTP en majorité), comme source d'énergie pour catalyser les réactions chimiques.

4.1.4.2 Analogie avec la F-ATPase

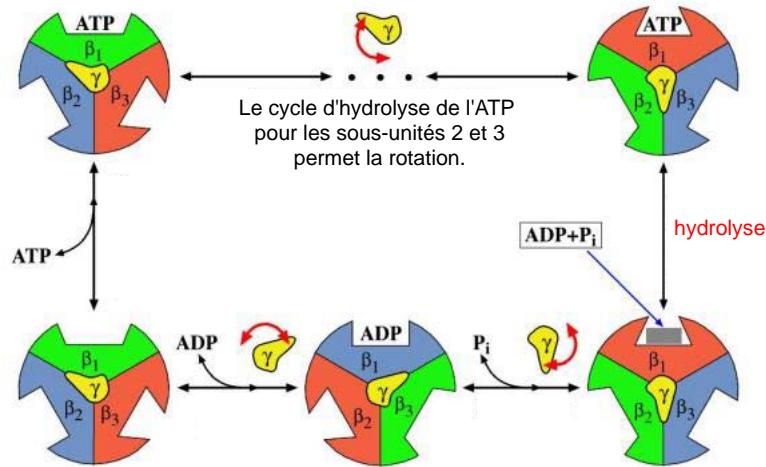
4.1.4.2.1 Points communs.

La V-ATPase avec sa structure bipartite V1 / V0 observée en microscopie électronique (Boekema, Ubbink-Kok et al. 1997), rappelle clairement la F-ATPase mitochondriale ou chloroplastique avec ses deux secteurs F1 et F0 (Kibak, Taiz et al. 1992; Nelson 1992). De plus les sous-unités catalytiques « A », « B » et « G » pour le secteur V1 de la V-ATPase, et « c » pour le secteur V0, présentent clairement une homologie de séquence avec leurs équivalents dans la F-ATPase (respectivement « β », « α », « b » et « c ») (Bowman, Tenney et al. 1988; Zimniak, Dittrich et al. 1988; Nelson 1989). Mieux, les deux pompes sont fonctionnellement très similaires puisque leurs rotors, dont les sous-unités sont apparentées, fonctionnent de façon similaire (Hirata, Iwamoto-Kihara et al. 2003), même si leurs propriétés catalytiques diffèrent quelque peu (Imamura, Nakano et al. 2003; Diez, Borsch et al. 2004; Diez, Zimmermann et al. 2004; Imamura, Takeda et al. 2005; Wilkens 2005). Ensuite, si la F-ATPase est principalement une ATP synthétase qui, en fin de chaîne respiratoire, utilise le gradient de protons accumulés dans l'espace intermembranaire mitochondrial pour synthétiser de l'ATP, elle peut également fonctionner comme une ATPase à protons à l'instar de la V-ATPase. Par ailleurs, lorsqu'elle hydrolyse l'ATP, la F-ATPase tourne en sens inverse de celui qui permet sa synthèse, comme la V-ATPase. Enfin, la V-ATPase est capable inversement de synthétiser de l'ATP bien qu'avec une faible efficacité (Hirata, Nakamura et al. 2000).

4.1.4.2.2 Différences.

Malgré les similitudes citées plus haut quelques différences essentielles persistent, sur les plans physiologique et structural. Tout d'abord, la V-ATPase est eucaryote et trouvée dans tous les compartiments membranaires hors organites semi-autonomes, quand la F-ATPase est procaryote et présente dans les organites semi-autonomes (Sun-Wada, Wada et al. 2003). Ensuite la V-ATPase est absolument essentielle à la vie (sauf chez la levure), quand certaines cellules de mammifères peuvent se passer de F-ATPase (Perzov, Padler-Karavani et al. 2001). Au point de vue structural, la F-ATPase contient 8 types de sous-unités quand la V-ATPase en contient au moins 13. Par ailleurs, les deux pompes présentent peu de similitudes au niveau de leurs stators, que ce soit en terme de similarité de séquences entre sous-unités analogues ou en terme de structure (Perzov, Padler-Karavani et al. 2001). Au niveau de la sous-unité « A » des V-ATPases une insertion de 90 acides aminés appelée région non-homologue présente également chez les A-ATPases est absente de la sous-unité « β » de la F-ATPase (Shao, Nishi et al. 2003; Maegawa, Morita et al. 2006)

Figure 47. MODELE DE FONCTIONNEMENT
DU ROTOR F1 DE LA F-ATPASE.



LEGENDE.

Ce modèle est également valable pour la V- et la A-ATPase (en remplaçant les sous-unités par leurs équivalents). Le code couleur représente l'état de la sous-unité concernée : vert = en attente d'ATP ou ATP juste fixé, rouge = hydrolyse de l'ATP, bleu = fixé à l'ADP. Le fonctionnement en décalé des trois sous-unités ATPasiques permet la rotation continue du rotor par crans de 120°.

et régule l'association V0-V1 (Shao and Forgac 2004). Enfin, les caractéristiques catalytiques de deux types de pompe diffèrent (Wilkens 2005).

4.1.4.3 V1 : un secteur cytosolique moteur, à activité ATPase.

Le secteur V1 dont on a vu la composition précédemment est en fait bipartite, formé d'un stator comprenant les sous-unités C, E, G et H, (Drory, Frolov et al. 2004; Fethiere, Venzke et al. 2004; Fethiere, Venzke et al. 2005) et d'un rotor composé des sous-unités A, B, F et D (Xu, Vasilyeva et al. 1999). Le stator comme son nom l'indique reste statique lors du fonctionnement de la pompe. Le rotor, lui tourne d'un angle de 120 degrés environ à chaque fois qu'un ATP est hydrolysé d'après le modèle proposé dès 1993 pour la F-ATPase et confirmé depuis pour la F- (Diez, Zimmermann et al. 2004) et la V-ATPase grâce à l'utilisation de billes couplées aux sous-unités « D » ou « F » (Imamura, Nakano et al. 2003).

Les types « A » et « B » de sous-unités V1 possèdent tous deux des sites de liaison à l'ATP (Nishi and Forgac 2002). La présence de six sites putatifs de fixation de l'ATP (3 sous-unités « A » et 3 sous-unités « B » par complexe V1) est confirmé chez les procaryotes comme *Enterococcus hirae* (Murata, Yoshikawa et al. 2002). Cependant, seuls les sites des sous-unités « A » seraient catalytiques (Zhang, Vasilyeva et al. 1995; MacLeod, Vasilyeva et al. 1998) et ils seraient conservés avec les A-ATPases (Maegawa, Morita et al. 2006). 3 ATP peuvent donc être séquentiellement hydrolysées au cours d'un seul cycle du rotor V1 (Figure 47). Les sites de fixation à l'ATP des sous-unités « B » non catalytiques (Liu, Kane et al. 1996) auraient un rôle régulateur de l'activité de la V-ATPase (Vasilyeva and Forgac 1996; MacLeod, Vasilyeva et al. 1998).

4.1.4.4 V0 : un secteur transmembranaire effecteur, transporteur de protons.

Le secteur V0 collabore à la V-ATPase en ménageant un passage contrôlé pour les protons. Ceci est révélé par l'action d'antibiotiques comme les bafilomycines et les concanamycines qui bloquent le passage des protons en fixant le secteur V0 sans provoquer de dissociation du complexe (Bowman, Graham et al. 2004), l'utilisation d'anticorps (Aviezer-Hagai, Padler-Karavani et al. 2003), et par des mutations des sous-unités de V0 (Kawasaki-Nishi, Nishi et al. 2001).

Bien que l'hexamère de protéolipides forme un pore, celui-ci est imperméable, et il semble que les protons traversent plutôt la membrane à l'interface entre la sous-unité « a » et les protéolipides du rotor V0 (Findlay and Harrison 2002). En effet, des mutations dans la sous-unité « a », à l'interface avec le rotor V0, sont capables, sans changement conformationnel, de bloquer le transport de protons (Kawasaki-Nishi, Nishi et al. 2001;

Findlay and Harrison 2002; Kawasaki-Nishi, Nishi et al. 2003). Le rotor est ainsi nommé car il effectue une rotation dans le sens inverse des aiguilles d'une montre vu de la membrane. La rotation dépendante de l'ATP (entrainée par le couplage au rotor V1 donc) a été observé grâce au couplage de billes sur des protéolipides de V0 (Yokoyama, Nakano et al. 2003).

4.1.4.5 Efficacité de couplage.

Il existe un couplage physique clair entre les deux secteurs puisque la fixation d'ATP sur V1 a un impact immédiat sur la structure de V0, et qu'inversement la fixation de la bafilomycine sur V0 induit un changement conformationnel de V1 (Landolt-Marticorena, Kahr et al. 1999).

Un découplage total entre hydrolyse de l'ATP et transport de protons est observé lorsque l'on mute la sous-unité « D » dans l'une ou l'autre des régions qui furent par la suite identifiées comme étant celles contactant les sous-unités de V1 d'une part et V0 de l'autre (Xu and Forgac 2000). Sur la base des différences d'efficacité de couplage constatées chez la levure entre les complexes contenant Vph1p (couplage le plus efficace) ou Stv1p, ce serait essentiellement au niveau de la partie C-terminale de la sous-unité « a » que ce couplage serait assuré (Kawasaki-Nishi, Bowers et al. 2001). La sous-unité « H » (Crider and Xie 2003) et la sous-unité « c » (Crider and Xie 2003) qui ne sont requises pour l'association V1-V0, sont également essentielles au couplage de l'activité ATPase et du transport de protons.

En dehors de différences de compositions du complexe en termes de sous-unités impliquées dans ce couplage, son efficacité varie en fonction du ratio de pH entre les deux compartiments que sépare la membrane dans laquelle la V-ATPase est encastrée. Ainsi pour une différence quasi-nulle, l'hydrolyse d'une molécule d'ATP permet de déplacer plus de 4 protons, contre seulement 2 protons lorsque la différence de pH atteint 4 unités (Kettner, Bertl et al. 2003).

4.2 Fonctions cellulaires de la V-ATPase.

La V-ATPase est associée à la membrane de nombreux organites des cellules eucaryotes. On la trouve ainsi au niveau des vésicules couvertes de clathrine, des granules des cellules chromaffines bovines, des endosomes, des lysosomes, des vésicules golgiennes, des vésicules synaptiques, du tonoplaste des plantes, des vacuoles de levure, de la membrane plasmique des ostéoclastes, des cellules de l'épithélium rénal et de

l'épiderme des amphibiens. En réalité elle est virtuellement présente dans chaque compartiment cellulaire hors organites semi-autonomes et noyau (Harvey and Wieczorek 1997; Kane 2006). Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels l'endocytose, le trafic protéique, l'osmorégulation, le stockage de métabolites, des processus sécrétoires divers, les mouvements cellulaires, l'activation d'enzymes sécrétées, etc. Je vais donc reprendre ici les données obtenues dans différents modèles (*Bos taurus*, *Manduca sexta*, *Torpedo californica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Caenorhabditis elegans*, *Plasmodium falciparum*, *Paramecium caudatum*, *Mus musculus*, *Homo sapiens sapiens*, etc.) pour illustrer les fonctions connues à ce jour de la V-ATPase (pour revues : (Nelson and Harvey 1999; Kane 2006)).

4.2.1 Maladies dans lesquelles la V-ATPase est impliquée.

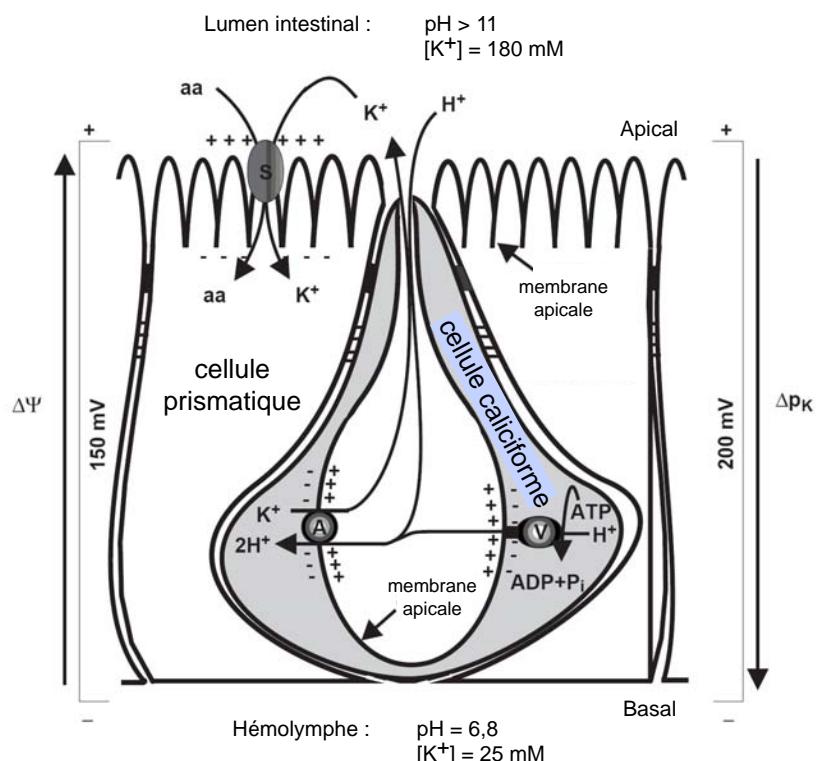
Des mutations touchant différentes sous-unités de la V-ATPase sont à l'origine de nombreuses maladies chez l'homme (Alper 2002; Pedersen 2002). Parmi celles-ci on peut citer l'ulcère (Papini, de Bernard et al. 1993), l'acidose rénale tubulaire (mutations dans les sous-unité « a4 » ou « B1 ») (Smith, Skaug et al. 2000; Stehberger, Schulz et al. 2003; Ochotny, Van Vliet et al. 2006; Yang, Li et al. 2006), l'ostéopétrose maligne infantile (mutations de la sous-unité « a3 » des ostéoclastes) (Li, Chen et al. 1999; Frattini, Orchard et al. 2000; Kornak, Schulz et al. 2000; Sobacchi, Frattini et al. 2001; Taranta, Migliaccio et al. 2003; Ogbureke, Zhao et al. 2005). La sous-unité « H » de la V-ATPase est également impliquée chez l'homme et le singe dans l'infection par le VIH (Geyer, Fackler et al. 2002; Geyer, Yu et al. 2002). Enfin, la V-ATPase est une cible d'intérêt en cancérologie

4.2.2 La création d'un différentiel de pH utilisable comme force motrice.

4.2.2.1 V-ATPase, osmorégulation et nutrition.

La V-ATPase est la pompe à protons essentielle (Nelson 1992) de la plupart des systèmes excréteurs eucaryotes, où elle génère le gradient de protons essentiel à la réalisation de tous les échanges osmotiques et de solutés (filtration et réabsorption) qui y ont lieu. Ainsi, elle est requise chez les champignons (Stevens 1992), dans les tubes de Malpighi chez les insectes (Wolfersberger 1992; Wieczorek, Brown et al. 1999; Weng, Huss et al.

Figure 48. UTILISATION DU GRADIENT DE PROTONS GENERE PAR LA V-ATPASE DANS L'INTESTIN MEDIAN DES INSECTES



LEGENDE.

Couplage en deux étapes entre la V-ATPase et le transporteur d'acides aminés (aa). La V-ATPase à la membrane apicale de la cellule caliciforme crée un gradient de protons, utilisé par un antiporteur H^+/K^+ pour excréter du potassium. Le gradient de potassium ainsi obtenu est ensuite utilisé par le symporteur $\text{K}^+/\text{acides aminés}$ à la membrane apicale de la cellule prismatique.

2003), au niveau de la cellule excrétrice chez *C. elegans* (Liegeois, Benedetto et al. 2006), dans les vacuoles contractiles de la paramécie (Stock, Gronlien et al. 2002; Wassmer, Froissard et al. 2005), au niveau du tonoplaste des cellules végétales (Ratajczak 2000; Dettmer, Hong-Hermesdorf et al. 2006), à la membrane apicale de l'épithélium rénal chez les vertébrés (Gluck, Nelson et al. 1992), et également à la membrane basolatérale (cette localisation basale est très surprenante à moins qu'il ne s'agisse ici d'une définition anatomique et non moléculaire et fonctionnelle des pôles basal et apical ?) des cellules riches en mitochondries des branchies du fongule (petit poisson d'aquarium) (Katoh, Hyodo et al. 2003). On peut également citer ici le cas des cellules riches en mitochondries de la peau des amphibiens (qui contribuent significativement à l'osmorégulation, l'excrétion et la respiration) qui requièrent apicalement la V-ATPase pour réguler le pH et la concentration en sodium de la peau exposée à des environnements osmotiques variés (Ehrenfeld and Klein 1997).

En dehors des systèmes excréteurs, la V-ATPase est présente dans tous les tissus et très abondante à la surface apicale des cellules épithéliales comme les cellules intestinales, où le gradient de protons est utilisé pour l'absorption de nutriments, à l'image de son rôle au niveau de la récupération des sucres et acides aminés solubles dans le rein. Par exemple, à la membrane apicale des cellules de l'intestin médian des insectes, le gradient de protons généré par la V-ATPase est utilisé par un antiporteur H+/K+ qui établit un gradient de potassium à son tour utilisé par des transporteurs pour importer des acides aminés (Figure 48) (Wieczorek, Huss et al. 2003). A titre d'anecdote, la V-ATPase est également vitale dans les ostéoclastes de rat pour l'import du fer (Hall 1994). Je tiens également à citer ici le fait que la V-ATPase est présente à la membrane plasmique des astrocytes où elle jouerait un rôle dans l'osmorégulation également (Philippe, Dubois et al. 2002).

4.2.2.2 V-ATPase et détoxification.

Le gradient de protons est certes utilisable pour l'import de petites molécules nutritives comme illustré précédemment, mais aussi pour l'export et la contention (dans les lysosomes et vacuoles) de toxiques. Ainsi chez la levure de boulanger, la V-ATPase est essentielle à la détoxification des métaux au niveau de la vacuole (Mn, Co, Ni, Zn, Se, etc.) et du cytosol (Cu, Cd) (Ramsay and Gadd 1997; Gharieb and Gadd 1998). Il en est de même au moins chez les crustacés (Ahearn, Mandal et al. 2004). C'est également vrai pour la détoxification de l'aluminium chez les plantes (Hamilton, Good et al. 2001).

4.2.2.3 V-ATPase et remplissage des vésicules synaptiques.

Au niveau du bouton synaptique, la terminaison axonale du neurone afférent est pleine de vésicules synaptiques. Ce sont de petits compartiments sphériques d'une cinquantaine de nanomètres de diamètre remplis d'un type de neurotransmetteur (GABA, acétylcholine,adrénaline, noradrénaline, glutamate, dopamine, sérotonine, neuropeptides etc.) qui définit le type de synapse (GABAergique, cholinergique, noradrénergique etc.) et si son influence sera plutôt inhibitrice ou excitatrice. Le remplissage des vésicules synaptiques en neuromédiateur est réalisé par des protéines transmembranaires enchâssées dans les vésicules immatures. Ces transporteurs vésiculaires sont spécifiques d'un type de neurotransmetteur (GABA, acétylcholine, glutamate, glycine, monoamines, pour revue voire (Eiden 2000) et utilisent comme moteur le gradient de protons existant entre les vésicules acides et le cytosol neutre, pour importer les neurotransmetteurs dans les vésicules (pour revue voire (Masson, Sagne et al. 1999), (Hell, Maycox et al. 1990; Mariussen, Mørch Andersen et al. 1999)). La densité finale des vésicules synaptiques en neuromédiateur étant de 10 à 1000 fois supérieure comparée au cytosol (Schuldiner, Shirvan et al. 1995), le gradient de protons moteur doit être constamment alimenté. L'alimentation du gradient est ATP-dépendante (Naito and Ueda 1983) et est inhibée par la bafilomycine A1 (Moriyama and Futai 1990), inhibiteur spécifique de la V-ATPase (Bowman, Siebers et al. 1988). C'est ainsi la V-ATPase vésiculaire qui consomme de l'ATP pour importer des protons dans la vésicule synaptique (Apps, Pryde et al. 1980; Apps, Pryde et al. 1980; Anderson, King et al. 1982; Moriyama, Maeda et al. 1992; Nelson 1993). Un autre argument qui abonde dans ce sens est l'incapacité des mutants *vha-12* (gène encodant une sous-unité « B » du secteur V1) à acidifier les vésicules synaptiques et à sécréter le neurotransmetteur (Weimer and Jorgensen 2003).

4.2.2.4 V-ATPase et remplissage des granules de sécrétion.

Le système qui couple le gradient de pH et le potentiel électrique membranaire créé par la V-ATPase au transport actif de petites molécules fonctionne aussi dans certaines cellules endocrines. Ainsi dans les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale, le remplissage des granules en catécholamines est médié par un antiport utilisant le gradient créé par la V-ATPase (Apps, Pryde et al. 1980; Apps, Pryde et al. 1980; Phillips and Apps 1980; Moriyama, Maeda et al. 1992).

4.2.2.5 Surexpression de la V-ATPase et survie en milieu acide.

La vie en milieu acide requiert une efficacité osmorégulatrice accrue en plus de dispositifs de protection physico-chimiques. La surexpression de la V-ATPase à la

membrane plasmique pour re-pomper à l'extérieur les protons et éviter une acidification du cytosol préjudiciable à la cellule, est un moyen utilisé de façon récurrente pour supporter de telles conditions de vie.

4.2.2.5.1 Tumeurs.

Depuis quelques années la recherche en cancérologie s'intéresse beaucoup au pH et donc à la V-ATPase en tant que cible thérapeutique (Bowman, Gustafson et al. 2003; Bowman and Bowman 2005; De Milito and Fais 2005; Lu, Qin et al. 2005). En effet, pour dégrader la matrice extracellulaire et tuer les cellules environnantes (pour se nourrir des nutriments ainsi libérés, et éventuellement pour se déplacer dans le cas des métastases), les cellules tumorales acidifient le milieu extracellulaire. Pour cela, elles sur-expriment la V-ATPase à leur membrane plasmique (Torigoe, Izumi et al. 2002; Sennoune, Bakunts et al. 2004) ce qui remplit la multiple-fonction de diminuer le pH extracellulaire, d'augmenter la sécrétion de protéases, de les activer par le pH bas, et de rendre la tumeur plus résistante aux conditions de pH acide qu'elle a elle-même générée, favorisant son développement au détriment des autres cellules (Sennoune, Luo et al. 2004).

4.2.2.5.2 V-ATPase et angiogenèse.

L'exposition des cellules à un pH extracellulaire acide est aussi un phénomène naturel au cours de l'angiogenèse, processus lors duquel les cellules microvasculaires endothéliales doivent migrer et évoluer dans un tel environnement. Il a aussi été montré dans ce contexte que la V-ATPase était requise (Rojas, Sennoune et al. 2006).

4.2.2.5.3 Malaria.

L'hématzoaire *Plasmodium falciparum*, parasite responsable de la malaria vit dans un environnement particulièrement hostile puisqu'il infecte successivement les hépatocytes puis les hématies dans lesquelles les conditions osmotiques sont extrêmes. A l'instar des cellules métastatiques, le parasite surexprime donc la V-ATPase à la surface de sa membrane plasmique, ainsi que dans les compartiments de dégradation des nutriments (vacuoles nutritives), et les vésicules claires qui alimentent la membrane plasmique (Moriyama, Hayashi et al. 2003). Cette surexpression de la V-ATPase à la membrane plasmique permet d'acidifier l'érythrocyte hôte et de conduire à sa lyse, ainsi qu'à supporter les conditions de pH induites.

4.2.3 La V-ATPase dans la voie endolysosomale.

4.2.3.1 Importance de la V-ATPase dans l'endocytose précoce.

Chez la levure *S. cerevisiae*, l'endocytose du colorant vital FM4-64 est ralentie dans les mutants de sous-unité « a » (Vph1p et Stv1p) de la V-ATPase, démontrant que la V-ATPase est requise pour l'endocytose précoce (Perzov, Padler-Karavani et al. 2002). Le même type d'expérience utilisant FM4-64 dans un mutant de la sous-unité « a1 » a conduit aux mêmes conclusions chez *Arabidopsis thaliana* (Dettmer, Hong-Hermesdorf et al. 2006). Chez les champignons, la V-ATPase est également requise au cours de l'endocytose (Liu, Mirschberger et al. 2002). L'importance de la V-ATPase dans ce processus a été ensuite démontrée chez *C. elegans* où l'endocytose des vitellines par les œufs est compromise lorsque l'on inactive la sous-unité « E » (VHA-8) (Choi, Ji et al. 2003), la sous-unité « C » (VHA-11) (données du laboratoire de Bart Grant, IWM 2005), ou les sous-unités « A » (VHA-13), « c / c' » (VHA-1, VHA-2, VHA-3), « c" » (VHA-4) (Liegeois, Benedetto et al. 2006). En concordance avec ces observations, la V-ATPase est trouvée dans les vésicules couvertes de clathrine et tout au long de la voie endolysosomale (Inoue, Wilkens et al. 2003) où elle joue aussi des rôles plus tardifs (voire point suivant). De plus, la sous-unité « H » de la V-ATPase (V1H chez l'homme) a la capacité de fixer Nef (protéine virale requise pour l'entrée du virus HIV - « Human Immunodeficiency Virus » - / SIV -« Simian Immunodeficiency Virus » - dans la cellule) et la chaîne mu2 du complexe adaptateur AP-2 (classiquement associé aux vésicules couvertes de clathrine), puis de provoquer l'internalisation de CD4, favorisant ainsi l'entrée du HIV / SIV médiaée par Nef (Geyer, Fackler et al. 2002; Geyer, Yu et al. 2002).

4.2.3.2 La V-ATPase est requise pour la dégradation lysosomiale.

4.2.3.2.1 Acidification des compartiments de la voie endolysosomiale.

L'acidification des endosomes tardifs et des lysosomes est bien connue comme dépendant de l'activité de la V-ATPase (Sun-Wada, Wada et al. 2003; Castillo-Avila, Abal et al. 2005). Cette acidification est essentielle à la dégradation du contenu lysosomal, ou vacuolaire chez les mycètes comme *Candida albicans* (Poltermann, Nguyen et al. 2005) ou *Dictyostelium* (Liu, Mirschberger et al. 2002), ainsi qu'à la fusion des lysosomes sécrétaires (Peters, Borst et al. 1991; Griffiths 1996; Blott and Griffiths 2002) avec la membrane plasmique dans la lignée hématopoïétique (Sun-Wada, Wada et al. 2003). L'acidification des organites de la voie endolysosomale concerne aussi notamment la dégradation de tout ce que les macrophages peuvent phagocytter. Ainsi l'inhibition de la V-ATPase compromet le potentiel bactéricide des macrophages résidant dans les alvéoles pulmonaires, chez qui la dégradation des bactéries phagocytées est alors inhibée (Bidani, Reisner et al. 2000).

4.2.3.2.2 Fusion endosome précoce - endosome tardif.

Comme on l'a vu à diverses reprises déjà, un certain nombre de fusions entre organites requiert un différentiel de pH entre « donneur » et « accepteur », qui est établit par la V-ATPase. C'est aussi vrai pour les compartiments de la voie endolysosomiale, par exemple, la fusion entre endosome précoce et tardif requiert la V-ATPase (Hurtado-Lorenzo, Skinner et al. 2006).

4.2.3.2.3 Fusion endosome tardif - lysosome.

De même la V-ATPase est nécessaire à l'acidification des endosomes tardifs et à leur fusion avec les lysosomes, permettant la dégradation subséquente de leur contenu (van Deurs, Holm et al. 1996).

4.2.4 L'acidification des organites sécrétoires.

4.2.4.1 Les vésicules synaptiques.

Comme évoqué ci-dessus, un différentiel de pH et de potentiel électrique mis en place par une pompe permet de faciliter la fusion *in vivo* entre deux compartiments comme un choc électrique ou osmotique *in vitro* (Ramos and Teissie 2000). Ce qui est vrai pour la voie endocytotique l'est aussi pour la fusion d'organites sécrétoires avec la membrane plasmique. Ainsi les vésicules pré-synaptiques requièrent la V-ATPase non seulement pour leur biogénèse et leur remplissage en neurotransmetteur, mais leur acidification est aussi déterminante pour leur capacité à fusionner avec la membrane plasmique et permettre la libération de leur contenu (Nelson 1993).

4.2.4.2 Les granules de sécrétion des cellules glandulaires.

Les cellules des glandes endocrines et exocrines possèdent également une intense activité sécrétoire reposant sur la sécrétion de granules (cellules chromaffines, cellules acineuses). Dans le cas des cellules acineuses du pancréas exocrine, les granules de sécrétion requièrent la V-ATPase pour leur sécrétion efficace mais aussi pour l'activation de leur cargo principal : le zymogène (Waterford, Kolodecik et al. 2005).

4.2.4.3 Les granules de sécrétion des éosinophiles.

De manière similaire, la dégranulation des éosinophiles requiert une acidification des granules aux dépends du cytosol (qui s'alcalinise) dépendante d'une pompe H+-ATPase activable par une augmentation de la concentration en calcium (Bankers-Fulbright, Kephart et al. 2004). Or dans d'autres contextes un signal calcium intervient en amont de l'activation de la V-ATPase (Han, Shao et al. 2005; Kane 2005; Dames, Zimmermann et al. 2006). De plus un traitement à la bafilomycine A1 (inhibiteur spécifique de la V-ATPase) induit une augmentation du pH des granules des éosinophiles et inhibe leur dégranulation (Kurashima, Numata et al. 1996). Il est donc très probable que ce soit la H+ V-ATPase qui soit responsable de ce processus.

4.2.4.4 Acidification des lysosomes sécrétoires.

La V-ATPase est requise précocement dans le processus de fécondation car elle acidifie la vacuole acrosomale, permettant la sécrétion et l'activation des hydrolases qui permettront au spermatozoïde d'atteindre l'ovule (Sun-Wada, Imai-Senga et al. 2002). L'acrosome est en fait un cas particulier de compartiment lysosomal, comme les granules lytiques des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (Griffiths 1996), dont l'acidification repose aussi sur l'activité de la V-ATPase (Togashi, Kataoka et al. 1997). En fait tous les types de lysosomes sécrétoires jusqu'à identifiés sont ainsi acidifiés par la V-ATPase (Blott and Griffiths 2002; Sun-Wada, Wada et al. 2003).

4.2.5 L'acidification de la matrice extracellulaire.

4.2.5.1 La V-ATPase dans les ostéoclastes.

Les ostéoclastes sont des cellules phagocytaires issues des mêmes précurseurs que les monocytes et macrophages, qui jouent un rôle crucial dans la dynamique de l'os chez les vertébrés. Leur activité est promue par les ostéoblastes qui sont responsables de la synthèse d'os, tandis que les ostéoclastes activés dégradent la matrice osseuse excédentaire. Pour ce faire, ils acidifient la matrice extracellulaire (MEC), ce qui permet aussi aux enzymes de dégradation de type métalloprotéinase de la dégrader (Harrell, McCawley et al. 2005; Henriksen, Sorensen et al. 2006). Cette acidification localement très importante repose sur l'activité de la V-ATPase à la membrane plasmique. Des mutations de sous-unités « a » de la V-ATPase sont ainsi responsables d'ostéopétroses, maladies dans

lesquelles l'os se développe au dépend du cartilage, bloquant les articulations (Kornak, Schulz et al. 2000; de Vernejoul and Benichou 2001; Rajapurohitam, Chalhoub et al. 2001).

4.2.5.2 Rôle de la V-ATPase dans la progression tumorale.

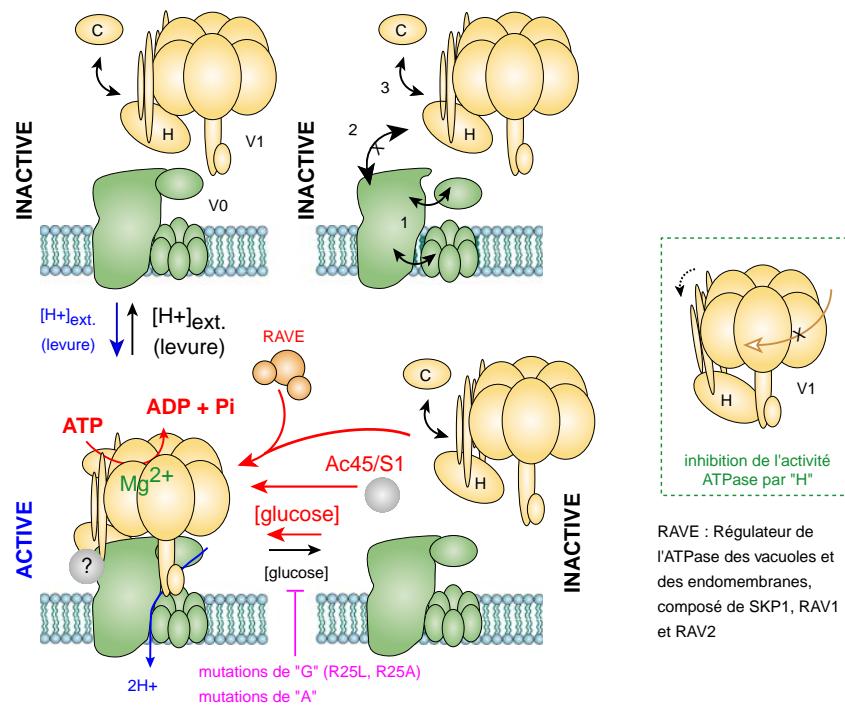
Depuis quelques années, le pH est devenu un facteur clé des études sur le cancer (Izumi, Torigoe et al. 2003) car les cellules tumorales se développent dans un microenvironnement particulièrement acide. En tant que principal régulateur du pH des cellules eucaryotes, la V-ATPase s'est donc révélée essentielle au développement des tumeurs solides, à différents niveaux. Ainsi, la surexpression de la V-ATPase à la membrane plasmique des cellules cancéreuses leur permet à la fois d'acidifier le milieu pour pouvoir dégrader la matrice extracellulaire (à l'instar des ostéoclastes dans le tissu osseux) (Sennoune, Luo et al. 2004) et de supporter cette acidité. Son niveau d'expression et son activité sont nettement augmentées chez les cellules mammaires tumorales invasives et à haut potentiel métastatique (Sennoune, Bakunts et al. 2004). D'autre part, l'inhibition par ARN interférent d'un protéolipide du complexe V₀ dans des cellules de carcinome hépatique réduit fortement la sécrétion de protons, l'activité des protéinases, et abolit de ce fait la capacité invasive *in vitro* et le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses *in vivo* (Lu, Qin et al. 2005). En outre, l'actine et la beta-intégrine essentielles à la migration cellulaire se fixent respectivement aux sous-unités B/C et c de la V-ATPase (Skinner and Wildeman 1999; Vitavska, Wieczorek et al. 2003; Chen, Bubb et al. 2004; Vitavska, Merzendorfer et al. 2005). Ainsi, la V-ATPase jouerait un rôle dans l'organisation du cytosquelette permettant aux cellules tumorales de se déplacer.

4.3 Adressage et régulation de la V-ATPase.

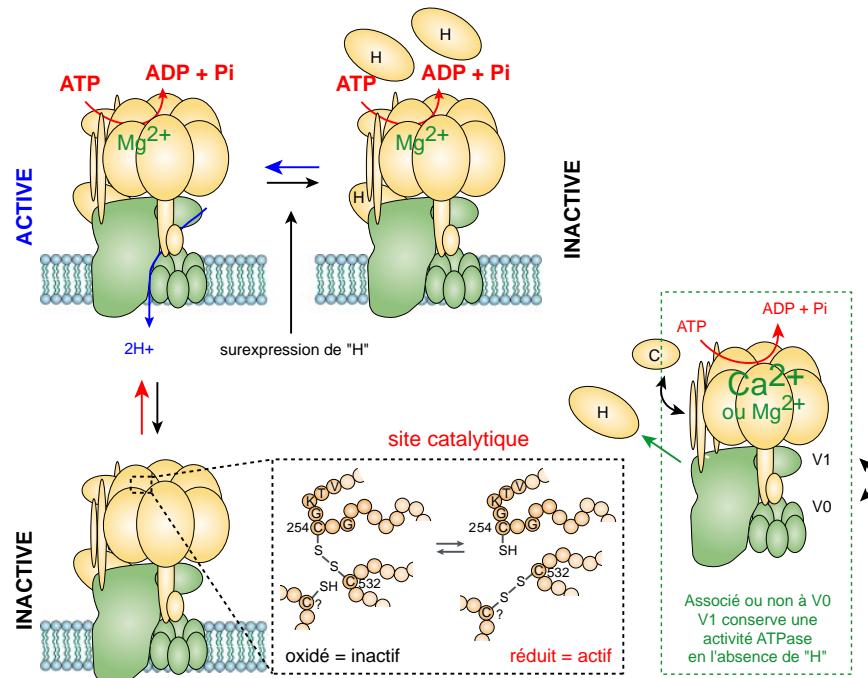
La régulation de la V-ATPase est un enjeu énergétique majeur pour la cellule car c'est d'une part un gros complexe abondant dans la cellule et coûteux à produire, et d'autre part son fonctionnement consomme énormément d'énergie. De plus elle est associée à des fonctions cellulaires, des organites et des tissus qui ne requièrent pas le même niveau d'activité de la pompe. Ainsi, la V-ATPase est-elle régulée aussi bien au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel (micro-ARN (Lall, Grun et al. 2006), épissage alternatif (Poea-Guyon, Amar et al. 2006)), post-traductionnel, qu'au niveau de son assemblage. De plus, sa structure modulable en deux secteurs assemblés indépendamment avant leur association réversible, permet un niveau de régulation supplémentaire. Enfin, l'adressage de

Figure 49. REGULATION DE LA V-ATPASE

A Régulation de la V-ATPase par dissociation du complexe V1/V0



B Régulation de la V-ATPase par modulation des activités de V0 ou de V1



LEGENDE.

A : L'augmentation du différentiel de pH transmembranaire induit une dissociation de V1 et V0. C'est aussi le cas lorsque l'on déstabilise le secteur V0 (1) en mutant ses sous-unités V0 (en haut). Le manque de glucose et certaines mutations des sous-unités A ou G induisent également une dissociation du complexe (en bas). Celle-ci entraîne une modification de la conformation de V1 par H⁺, et l'inhibition de son activité ATPase (encart à droite). RAVE et Ac45/S1 favorisent l'association.

B : La surexpression de la sous-unité H inhibe le couplage V0 - V1 et le transport de protons (en haut). Son absence découple également V0 et V1, bloquant le transport de protons et réduisant l'activité ATPase. Une haute concentration de calcium peut à ce moment-là se substituer au Mg²⁺ pour permettre une activité ATPase réduite (encart à droite). L'activité de la pompe peut également être complètement inhibée par des mutations ou des modifications par des agents oxydants des sites catalytiques des sous-unités A (en bas).

la V-ATPase qui fait intervenir des interactions avec d'autres protéines via des domaines de liaison se trouvant sur différentes sous-unités de V0 ou de V1, permet de réguler l'activité de la V-ATPase en un site donné. J'ai choisi de concentrer cette partie sur les régulations post-traductionnelles particulières de la V-ATPase.

4.3.1 Régulation de l'association V1-V0.

Comme la V-ATPase est en amont de nombreux couplages bioénergétiques essentiels au métabolisme cellulaire, une grande quantité d'énergie (sous forme d'ATP) est investie dans le fonctionnement de cette pompe. C'est un des nœuds principaux du réseau énergétique de la cellule, ce qui explique que l'activité de la V-ATPase soit très régulée.

A l'inverse de la F-ATPase dont chaque secteur indépendamment est actif (F0 seul permet la translocation de protons dans le sens du gradient, et F1 seul fonctionne comme une ATP hydrolase), les secteurs V0 et V1 ne conservent aucune des activités de la V-ATPase lorsqu'ils sont dissociés (Kane and Parra 2000). Ainsi un excellent moyen de régulation, et le principal moyen utilisé par la cellule, est de moduler l'association de V0 et V1.

4.3.1.1 Disponibilité du glucose et régulation de la V-ATPase

En 1995, deux laboratoires indépendants travaillant sur *S. cerevisiae* et *M. sexta* ont observé respectivement qu'une privation de 2 à 5 minutes de glucose chez la levure (Kane 1995), et la diète qui accompagne chaque mue chez le sphinx du tabac (Sumner, Dow et al. 1995), entraînaient un découplage de la V-ATPase et une dissociation de V1 de V0 (Kane 2000; Kane and Smardon 2003) (Figure 49A). Ce mécanisme est réversible (Parra and Kane 1998; Kane and Parra 2000) dans ces deux cas qui représentent des situations fréquentes à l'état naturel. Les microtubules sont impliqués dans ce processus car leur perturbation inhibe complètement le phénomène de dissociation induit par la carence en glucose (Xu and Forgac 2001). De façon intéressante, chez la levure, la dissociation induite par la carence en glucose ne touche que les complexes vacuolaires qui contiennent la sous-unité « a » Vph1p et non ceux qui contiennent Stv1p et transitent entre le TGN et les endosomes (Kawasaki-Nishi, Bowers et al. 2001). La dissociation cible en fait la partie N-terminale particulière de Vph1p, ce qui explique cette spécificité (Kawasaki-Nishi, Bowers et al. 2001).

De façon consistante avec ces précédentes observations, deux des enzymes de la glycolyse interagissent physiquement avec la V-ATPase. Ainsi la phosphofructokinase 1 chez l'homme fixe la partie C-terminale de la sous-unité « a4 » exprimée par l'épithélium

rénal (Su, Zhou et al. 2003). D'autre part, l'aldolase s'associe avec les sous-unités « a », « B » et « E » (Lu, Holliday et al. 2001) par différents domaines de fixation (Lu, Sautin et al. 2004). De plus, les cellules mutantes pour l'aldolase présentent des phénotypes similaires à celles dont l'activité V-ATPase est altérée, ainsi que des défauts d'expression et d'association des secteurs V0 et V1 de la V-ATPase (Lu, Holliday et al. 2001; Lu, Sautin et al. 2004). Enfin l'association entre aldolase et V-ATPase est renforcée en présence de glucose, suggérant que l'aldolase fonctionnerait comme un senseur de glucose pour moduler l'activité de la V-ATPase (Lu, Sautin et al. 2004) (Figure 49A).

4.3.1.2 Importance des « tiges statiques » dans la stabilité du complexe.

Des mutations ponctuelles de la sous-unité « G » (R25A et R25L) qui participe aux « tiges statiques » connectant V1 et V0 (Charsky, Schumann et al. 2000) (Figure 49A), mais aussi des mutations de la région non-homologue de la sous-unité « A » du rotor V1 (Shao, Nishi et al. 2003; Shao and Forgac 2004), limitent la dissociation du complexe en cas de privation de glucose, probablement en stabilisant les « tiges statiques » qui seraient formées de dimères « E/G » (Arata, Baleja et al. 2002; Arata, Nishi et al. 2002).

4.3.1.3 Le complexe RAVE et la réassocation de V1 et V0.

Une approche protéomique chez la levure *S. cerevisiae* (Seol, Shevchenko et al. 2001) pour trouver de nouveaux partenaires protéiques de Skp1p (une sous-unité d'ubiquitine ligase E3) a permis d'identifier Rav1p et Rav2p par spectrométrie de masse, deux nouvelles protéines, avec lesquelles Skp1p forme un complexe contenant plusieurs sous-unités de V1. Mieux, les mutants de *rav1Δ* et *rav2Δ* arborent des phénotypes semblables à - mais moindres que - ceux des mutants de V-ATPase, et le mutant *rav1Δ* présente un défaut de réassemblage de la V-ATPase après restauration du glucose dans une culture privée de glucose pendant quelques minutes (Figure 49A). Le complexe SKP1/RAV1/RAV2 a été par la suite baptisé RAVE (« Regulation of ATPase on Vacuoles and Endomembranes »). Il a été montré que RAVE s'associe *in vivo* avec V1, en l'absence de V0, indépendamment de la privation de glucose, et que chez les mutants *rav1Δ* et *rav2Δ* V1 et V0 s'associent difficilement même dans des conditions de culture où le glucose n'est pas limitant (Smardon, Tarsio et al. 2002). De plus, les mutants de RAVE présentent un défaut d'association de V1 et V0, même dans un fond mutant qui ne permet pas la dissociation du complexe après assemblage (Smardon, Tarsio et al. 2002). Par ailleurs, Kane et coll. ont décrit en 1999 (Kane 1999; Kane, Tarsio et al. 1999) des étapes d'assemblage précoce de secteurs V1 et V0 incomplets. Ainsi, on peut penser que RAVE interviendrait non seulement pour rétablir

l'association V1/V0 après dissociation réversible, mais aussi dans une étape précoce de l'assemblage du complexe V1/V0 initial. Enfin, différentes observations et données non publiées du laboratoire de Kane suggèrent que RAVE fixe V1 au niveau des sous-unités E/G (Kane and Smardon 2003), ce qui est cohérent avec ce qui suit.

4.3.1.4 Les protéines VTC chez les plantes.

Chez le citronnier, les protéines VTC1 à 4 interagissent directement avec la V-ATPase au niveau du secteur V0. Selon Müller et coll. (Muller, Neumann et al. 2003), elles influeraient sur la stabilité du complexe V1-V0 et favoriseraient la fonction de V0 dans la fusion des vacuoles (cf. 4.4).

4.3.1.5 Régulation via la sous-unité « C » et les phosphorylations de V1.

De façon générale, la régulation de l'association V1 – V0 repose souvent sur des modifications conformationnelles de la sous-unité « C » (Gruber 2005). Très récemment, il a même été montré chez *Arabidopsis thaliana* que la sous-unité « C » pouvait être phosphorylée en de multiples sites par la kinase WNK, ainsi que les sous-unités A, G et B ou H (Hong-Hermesdorf, Brux et al. 2006).

4.3.1.6 L'importance du pH pour la stabilité de l'association V0 – V1.

La V-ATPase établissant un gradient de pH et un différentiel de tension électrique de part et d'autre de la membrane où elle est intégrée, il n'est pas surprenant que son activité puisse être régulée par une boucle de régulation négative impliquant des senseurs de pH. C'est en effet ce qui est observé dans les ostéoclastes de souris, qui adaptent leur activité V-ATPasique en fonction du pH et des concentrations de cations divalents extracellulaires (Sakai, Kawasaki et al. 2006). De façon similaire, en étudiant les mutants *btn1* de levure qui présentent une altération du pH vacuolaire et cytosolique, il a été observé que l'activité de la V-ATPase était modifiée pour compenser ce défaut de pH (Padilla-Lopez and Pearce 2006). Inversement, la neutralisation du pH lumenal par la chloroquine prévient toute dissociation du complexe V1 – V0 même en absence de glucose, montrant ainsi que le pH de la vacuole détermine largement l'état d'activité de la V-ATPase (Shao and Forgac 2004; Inoue, Wang et al. 2005).

L'étude du mutant de *Saccharomyces cerevisiae* vph6 a mis en évidence en 1995 un rôle de VPH6 dans la régulation de la V-ATPase via la calcineurine (Hemenway, Dolinski et al. 1995). Dans cet article il est ainsi montré qu'à la fois VPH1 (sous-unité « a ») et

conséquemment VMA1 (sous-unité « A ») sont absentes de la vacuole des mutants vph6, ce que les auteurs attribuent à une mauvaise association de V1 avec V0, entraînant une dégradation rapide de V0 et donc son indétectabilité. En fait la calcineurine régulerait directement une autre ATPase (PMA1), entraînant une acidification du milieu extracellulaire, qui provoquerait la dissociation de la V-ATPase (Hemenway, Dolinski et al. 1995).

4.3.2 Régulation de l'activité de la V-ATPase sans dissociation du complexe.

4.3.2.1 Inhibition directe de l'activité ATPase.

Comme évoqué plus haut, des analogues de l'ATP fixés sur les sous-unités « B » au niveau des sites non-catalytiques sont capables de réduire l'activité ATPase sans provoquer de dissociation du complexe (Zhang, Vasilyeva et al. 1995; Vasilyeva and Forgac 1996; MacLeod, Vasilyeva et al. 1998).

Un autre mécanisme permet de contrôler l'activité ATPase de la pompe au niveau des sites catalytiques des sous-unités « A » en induisant la formation réversible de ponts disulfures (Feng and Forgac 1992; Feng and Forgac 1994), ce qui pourrait se produire *in vivo* sous l'action du monoxyde d'azote ou de S-nitrosothiols (Forgac 1999).

4.3.2.2 Modulation du transport de protons et de l'ATPase par fixation à V0.

4.3.2.2.1 *Les drogues inhibitrices de la V-ATPase qui fixent V0.*

C'est par ce mécanisme que la plupart des drogues spécifiques de la V-ATPase agissent : bafilomycines (Bowman, Siebers et al. 1988), concanamycines (Drose and Altendorf 1997; Whyteside, Meek et al. 2005) et chondropsines (Bowman, Gustafson et al. 2003). Elles se fixent au niveau des sous-unités « c » (Bowman and Bowman 2002; Huss, Ingenhorst et al. 2002; Bowman, Graham et al. 2004) et « a » (Wang, Inoue et al. 2005). Initialement, leur effet inhibiteur sur l'activité ATPase ne suggérait pas un mécanisme d'action passant par V0 (Hanada, Moriyama et al. 1990). D'autres drogues comme la salicylihalamide A (active uniquement sur les V-ATPases de vertébrés) se fixent ailleurs sur le secteur V0, favorisent l'association avec V1, et inhibent l'activité ATPase de la pompe ainsi formée (Xie, Padron et al. 2004). L'un des enjeux actuels pour la recherche sur la V-ATPase mais aussi pour les approches thérapeutiques des maladies humaines qui y sont liées est le développement de nouveaux inhibiteurs capables de cibler sélectivement un

complexe V-ATPase particulier. De tels inhibiteurs commencent à voir le jour : ainsi il existe un capable de toucher la V-ATPase ostéoclastique sans inactiver la V-ATPase lysosomale (Niikura, Takano et al. 2004). De nouveaux inhibiteurs photoactivables ont aussi été développés (Shen, Inoue et al. 2005).

4.3.2.2.2 Inhibition de V0 via la modification de son environnement membranaire.

Bien que le mécanisme ne soit pas encore élucidé, il est possible que l'inhibition de l'extrusion de protons par la V-ATPase, induite par la calcitonine (drogue utilisée dans les traitements contre l'ostéoporose) et dépendante de la protéine kinase A (PKA), mais non de la protéine kinase C (PKC) repose également sur une inactivation du secteur V0 via une modification de l'environnement lipidique membranaire (Kajiya, Okamoto et al. 2003). In vivo, ce type d'inhibition n'a jamais été rapporté. Inversement, en revanche, l'angiotensine II et la concentration cytosolique de calcium semblent activer la V-ATPase par un processus médié par la PKC et non PKA dans les cellules épithéliale des tubules proximaux du rein de rat (Carraro-Lacroix and Malnic 2006). Le mécanisme impliqué pourrait également reposer sur une modification de la composition lipidique de la membrane environnant V0.

4.3.2.3 Inhibition indirecte du transport de protons par découplage de V1 et V0.

Le transport de protons peut aussi être inhibé indirectement par un découplage de V1 et V0. Ainsi chez des mutants dépourvus des sous-unités « C » ou « H », bien que V1 et V0 s'assemblent bien, leur association est largement compromise et les complexes ainsi formés sont inactifs, indiquant que ces sous-unités sont importantes pour stabiliser l'association V1/V0 et permettre leur couplage fonctionnel (Figure 49B). En fait, des mutations ponctuelles de « C » (F260A, Y262A, F385A) entraînant une mauvaise insertion de « C » dans le complexe, ont révélé que « C » stabilisait le complexe aux dépends de l'efficacité de la pompe (Curtis, Francis et al. 2002). D'autre part, lorsque la sous-unité « H » (Vma13p) est surexprimée chez la levure, cela induit la formation de complexes aberrants où l'activité ATPase est conservée mais le couplage V1 - V0 perdu (Keenan Curtis and Kane 2002). Il en va de même pour la V-ATPase extraite de cerveau de bœuf, où il a aussi été montré que le calcium, d'autres cations divalents, et certains phospholipides pouvaient induire un découplage de V1 et V0, inactivant ainsi la V-ATPase sans conduire à sa dissociation (Crider and Xie 2003).

4.3.3 Interactions avec la V-ATPase : rôles dans l'adressage et la régulation du complexe ?

La V-ATPase est un complexe protéique volumineux qui possède avec ses différentes sous-unités, et aussi bien au niveau de V1, que de V0, des sites de fixation à des protéines régulatrices et au cytosquelette. D'autre part c'est un complexe ancien, dérivé probablement des A-ATPases comme on l'a vu au 6.1. En outre, l'expansion de son rôle dans la cellule et la diversification de ses sous-unités (cas extrême : les sous-unités « a » de *Paramecium*, (Wassmer, Kissmehl et al. 2006)) sont allées de pair avec la compartimentation des cellules eucaryotes. Ces trois aspects ont rendu très probables l'apparition de rôles autres que celui de pompe à protons au cours de l'évolution, et de régulations encore largement sous-estimés.

4.3.3.1 Cytosquelette d'actine et adressage apical.

L'ensemble des exemples qui suivent montre que les relations entre cytosquelette d'actine et V-ATPase sont déterminantes pour la localisation correcte de ce complexe dans les cellules polarisées, ce que mes observations dans l'épiderme de *C. elegans* confirment également (cf. partie Résultats, Article 1).

4.3.3.1.1 *Interaction physique actine-V-ATPase.*

Plusieurs études utilisant des V-ATPases extraites de la moelle de souris (Lee, Gluck et al. 1999), du rein de bœuf (Lee, Gluck et al. 1999; Holliday, Lu et al. 2000) et du cerveau de bœuf (Holliday, Lu et al. 2000), ont prouvé que la V-ATPase pouvait fixer l'actine fibreuse par ses sous-unités « B » (« B1 » pour le rein et « B2 » pour le cerveau). De plus, une autre étude réalisée chez *M. sexta* a montré que les sous-unités « B » et « C » sont toutes deux impliquées dans la fixation à l'actine fibreuse (Vitavská, Wieczorek et al. 2003). Le site de fixation de la sous-unité « B » a par la suite été précisé par des travaux réalisés dans les ostéoclastes de rat (Chen, Bubb et al. 2004).

4.3.3.1.2 *Chez la levure.*

En plus d'interactions directes observées in vitro, il a été montré chez la levure que des mutants de la sous-unité « E » (Vma4p) présentaient parmi d'autres phénotypes morphologiques et physiologiques, une délocalisation de l'actine (Zhang, Parra et al. 1998). Aucune interaction directe actine – sous-unité « E » n'ayant jamais été montrée, il est probable que la délocalisation de l'actine soit un effet indirect, du à un changement conformationnel du secteur V1 ou indirectement à un problème de trafic cellulaire.

4.3.3.1.3 Dans les ostéoclastes.

Les études sur les relations entre V-ATPase et cytosquelette ont, entre autres, découlé d'observations faites sur des ostéoclastes de souris (oc/oc) ostéosclerotiques qui présentaient un défaut de localisation de la V-ATPase et de formation de la bordure dentelée (Nakamura, Takahashi et al. 1997; Vitavska, Wieczorek et al. 2003; Zuo, Jiang et al. 2006). Il a été montré que ce défaut de formation de la bordure dentelée était clairement lié à une sévère désorganisation du cytosquelette d'actine auquel le secteur V1 de la V-ATPase se fixe (Vitavska, Wieczorek et al. 2003; Zuo, Jiang et al. 2006). De façon intéressante, l'action de la bafilomycine A1 inhibe également la formation de cette spécialisation des ostéoclastes (Sahara, Itoh et al. 2003). Or la bafilomycine A1 se fixe sur le secteur V0 de la V-ATPase (Bowman, Graham et al. 2004). Cela signifierait que le secteur V0 est aussi requis pour la formation de cette bordure, indépendamment de la fixation à l'actine médiée par V1. Serait-ce par un mécanisme lié à la fusion membranaire (cf. 4.4.3), parce qu'un ancrage membranaire de l'actine via V1 puis V0 est requis, ou parce que la fonction de pompe est requise ? La calcitonine qui induit spécifiquement une disruption du réseau d'actine délocalise également la V-ATPase (Okumura, Mizoguchi et al. 2006) ce qui renforce plutôt un modèle d'adressage de la V-ATPase par sa fixation à l'actine, que l'inverse.

4.3.3.1.4 Dans la bordure en brosse chez la drosophile.

La spectrine associée au cytosquelette d'actine dans la bordure en brosse de la Drosophile est essentielle à la formation de cette bordure, mais aussi à la localisation apicale de la V-ATPase de façon similaire à ce qui est observé dans les ostéoclastes murins (Phillips and Thomas 2006)

4.3.3.1.5 Chez l'embryon précoce de Xénope.

S'il ne s'agit pas à proprement parler d'une localisation apicale de la V-ATPase, c'est en tout cas une localisation asymétrique de la V-ATPase médiée par sa fixation à l'actine, qui est à l'origine de la mise en place d'un gradient de protons déterminant pour la latéralisation de l'embryon de Xénope (cf. 5.2.7) (Adams, Robinson et al. 2006).

4.3.3.1.6 Rôle de la gelsoline.

La gelsoline est une protéine activée par le calcium qui capte l'actine et prévient sa polymérisation. Elle est présente en grande quantité dans l'épididyme de rat où il a été montré que l'accumulation de V-ATPase au pôle apical était induite par l'AMPc produit par l'activité de l'adénylyl-cyclase en réponse à un pH luminal alcalin (Pastor-Soler, Beaulieu et al. 2003). Cette accumulation apicale de V-ATPase est également dépendante de l'activité de la gelsoline (Beaulieu, Da Silva et al. 2005). La gelsoline est également fortement

exprimée chez d'autres cellules polarisées présentant une accumulation apicale de V-ATPase, comme les ostéoclastes et les cellules intercalaires du rein. Ainsi il semble que la localisation apicale de la V-ATPase requiert un cytosquelette d'actine passif et non en polymérisation active (Beaulieu, Da Silva et al. 2005).

4.3.3.1.7 Régulation par une protéine associée aux cyclases (CAP) ?

Bien qu'on ne sache pas exactement comment, l'adressage correct de la V-ATPase chez Dictyostelium dans le système endosomal requiert une protéine associée aux cyclases (CAP) qui interagit physiquement avec la V-ATPase (Sultana, Rivero et al. 2005). Les auteurs avancent que CAP serait requise pour le transport des vésicules contenant la V-ATPase et le maintien du système endosomal, probablement en lien avec l'actine.

4.3.3.2 V-ATPase et beta(1)-intégrine.

On vient de voir que le secteur V1 était capable de lier l'actine. Le secteur V0 lui, et plus particulièrement les petites (16 kDa) sous-unités « c » du rotor lient la beta(1)-intégrine d'après des expériences de double-hybridre et de coimmunoprécipitation. (Skinner and Wildeman 1999). D'autre part, la sous-unité « c » et la beta(1)-intégrine colocalisent au niveau des complexes focaux d'adhésion dans les myoblastes en culture, et la surexpression ou l'expression d'un dominant-négatif de cette sous-unité « c » entraîne un défaut de morphologie cellulaire dans les myoblastes et les fibroblastes en culture (Skinner and Wildeman 1999). Des études ultérieures ont clairement confirmé que le domaine transmembranaire IV de la sous-unité « c » interagit avec la beta(1)-intégrine, inhibant sa glycosylation. Ensuite, son expression diminue spécifiquement le niveau d'expression de la beta(1)-intégrine, et semble inhiber l'association de celle-ci avec la calnexine, qu'elle semble pouvoir aussi lier (Lee, Skinner et al. 2004).

4.3.3.3 Ac45 : une sous-unité régulatrice des métazoaires.

Ac45 est une sous-unité régulatrice accessoire de la V-ATPase dont la forme mature est un polypeptide de 27 à 29 kD glycosylé et atteignant ainsi 40kD. Elle a été identifiée dans les cellules chromaffines bovines (Supek, Supekova et al. 1994) et trouvée fortement exprimée dans les cellules mélanotropes du xénope (Holthuis, Jansen et al. 1999). Cette sous-unité semble spécifique des métazoaires et est peu conservée entre vertébrés et invertébrés (Schoonderwoert and Martens 2002). Elle est néanmoins essentielle au développement du blastocyste chez la souris (Schoonderwoert and Martens 2002) et au développement embryonnaire chez *C. elegans* (son inactivation par ARNi induit une létalité

embryonnaire ou larvaire). (Schoonderwoert, Jansen et al. 2002; Schoonderwoert and Martens 2002; Schoonderwoert and Martens 2002). Elle peut lier V0 (Getlawi, Laslop et al. 1996), est préférentiellement associée à la membrane ou aux vacuoles, et possède une queue cytoplasmique très conservée possédant un signal d'internalisation atypique (Jansen, Holthuis et al. 1998). Si Ac45 semble impliquée dans l'activation de la V-ATPase, son fonctionnement et son influence exacte sur la V-ATPase sont encore confus (Schoonderwoert, Jansen et al. 2002).

4.3.3.4 V-ATPase et radeaux lipidiques.

La V-ATPase est un complexe trouvé associé aux radeaux lipidiques riches en cholestérol et sphingolipides (DRMs : « Detergent Resistant Membranes ») (Yoshinaka, Kumanogoh et al. 2004), et entre autres au niveau du Golgi (Gkaniragas, Brugger et al. 2001) et des phagosomes (Dermine, Duclos et al. 2001). Ensuite, l'accumulation induite pharmacologiquement du cholestérol dans les endosomes tardifs multivésiculaires (riches en LBPA), prévient la localisation de la V-ATPase à la bordure dentelée des ostéoclastes (membrane apicale pauvre en LBPA et riche en cholestérol en conditions normales) (Zhao and Vaananen 2006). De plus, l'activité de la V-ATPase elle-même dépend du cholestérol (Perez-Castineira and Apps 1990; Yoshinaka, Kumanogoh et al. 2004) et de certains sphingolipides essentiel à la formation d'un complexe V1 actif (Chung, Lester et al. 2003). Comme évoqué plus haut, la sous-unité « c » (16 kD) de la V-ATPase a la capacité de lier la β -intégrine, mais aussi de délocaliser une forme inactive de celle-ci dans les DRMs (Lee, Skinner et al. 2004), montrant que les protéolipides ont une certaine affinité pour ces domaines. Enfin, la V-ATPase est également associée aux cavéoles (Sprenger, Fontijn et al. 2006).

4.3.4 Redondance génétique des sous-unités et diversité des complexes V-ATPase.

La redondance génétique dérive généralement d'événements de duplication de gènes qui ont par la suite évolué indépendamment, accumulant des mutations spécifiques (neutres ou pas) et qui se sont souvent retrouvées sous la dépendance de séquences régulatrices différentes, permettant leur expression à des temps, des lieux ou des niveaux différents.

4.3.4.1 Redondance génétique des sous-unités « a ».

La sous-unité « a » est la plus grosse sous-unité du complexe V-ATPase. Elle est déterminante pour l'association de V0 et V1, essentielle à la formation de V0 et pour différents processus de régulation de la fonction de V0 (voir 5.4) et de la V-ATPase. De plus elle est encastrée dans la membrane et détermine la localisation du complexe V0 auquel elle participe. C'est probablement pour cela que cette sous-unité est celle qui possède, toutes espèces confondues, le plus d'isoformes : en disposant de différentes sous-unités « a », un organisme peut assembler, sans changer les autres sous-unités, différents complexes V0 et V0+V1 aux propriétés très différentes en termes de stabilité, efficacité de couplage, sensibilité à différents régulateurs, localisation intracellulaire, etc.

4.3.4.1.1 Redondance génétique et expression tissu-spécifique.

La redondance génétique des sous-unités « a » s'explique en partie par une tissu-spécificité chez les métazoaires. Ainsi chez *C. elegans*, il existe 4 gènes codant pour des sous-unités « a » : *vha-5*, *vha-6*, *vha-7*, *unc-32* (Oka, Toyomura et al. 2001). VHA-5 est exprimée dans l'épiderme, le canal excréteur, les cellules supports des amphides et phasmides, la vulve, le rectum, l'utérus, et la cellule excrétrice, tandis que VHA-7 est spécifiquement épidermique, VHA-6 principalement intestinale, et UNC-32 est quasi-ubiquitaire chez l'embryon et neuronale chez la larve et l'adulte (Oka, Toyomura et al. 2001; Pujol, Bonnerot et al. 2001; Liegeois, Benedetto et al. 2006). Chez la souris on trouve également 4 sous-unités « a » : « a1 » à « a4 », dont les trois premières ont été identifiées en 2000 (Nishi and Forgac 2000; Toyomura, Oka et al. 2000) et la sous-unité « a4 » identifiée en 2001 (Oka, Murata et al. 2001). Les sous-unités « a1 », « a2 » et « a3 » paraissent ubiquitaires. Cependant, « a1 » est préférentiellement exprimée dans le cerveau et le cœur, « a2 » dans le foie et le rein, la sous-unité « a3 » est exprimée dans le foie, le rein, le cœur, la rate, les poumons et le cerveau (Nishi and Forgac 2000), mais est spécifiquement induite dans les ostéoclastes en différenciation (Toyomura, Oka et al. 2000) et est plus forte dans les ostéoclastes qui ont la plus forte activité ostéoclastique (Manolson, Yu et al. 2003) et ne semble pas essentielle ailleurs (Ochotny, Van Vliet et al. 2006). Quant à la sous-unité « a4 », elle est spécifique des cellules intercalaires α et β de l'épithélium rénal (Oka, Murata et al. 2001; Jouret, Auzanneau et al. 2005; Karet 2005; Ochotny, Van Vliet et al. 2006). Enfin, chez la Drosophile où il existe également 4 sous-unités « a », à l'instar de UNC-32 chez le nématode, VHA100-1 est spécifiquement embryonnaire et neuronale (Hiesinger, Fayyazuddin et al. 2005). En revanche, chez les plantes il ne semble pas exister de tissu-spécificité des trois isoformes de la sous-unité « a » (VHA-a1, VHA-a2, VHA-a3) (Dettmer, Hong-Hermesdorf et al. 2006).

4.3.4.1.2 Des répartitions subcellulaires distinctes entre sous-unité « a » différentes.

Chez la souris et l'homme, les 4 sous-unités « a » : « a1, a2, a3, a4 » présentent une tissu-spécificité comme cité précédemment. Cependant, certaines sous-unités « a » sont co-exprimées dans le même tissu et présentent des localisations subcellulaires distinctes. Ainsi, dans les ostéoclastes de souris, la sous-unité « a3 » est spécifiquement adressée aux endosomes/lysosomes et à la membrane apicale, probablement pour participer aux complexes V-ATPases chargés d'acidifier la matrice extracellulaire (Toyomura, Murata et al. 2003). Dans l'épithélium rénal, la sous-unité « a4 » est aussi spécifiquement adressée à la membrane apicale (Oka, Murata et al. 2001; Stehberger, Schulz et al. 2003). Dans l'épididyme de rat, la sous-unité « a2 » et plusieurs isoformes de « a1 » sont exprimées et présentent des localisations subcellulaires distinctes. Ainsi le variant « a1-I » est spécifiquement adressé aux verrucosités axonales tandis que l'isoforme « a1-IV » se trouve à la fois dans les dendrites et les terminaisons axonales, et que « a2 », à l'instar de Stv1p chez la levure, est localisée au niveau du TGN (Poea-Guyon, Amar et al. 2006). Chez la torpille, au moins deux isoformes sont également co-exprimées dans les neurones et présentent des localisations subcellulaires distinctes (Morel, Dedieu et al. 2003). Ensuite, chez *C. elegans* le gène *unc-32* encode également plusieurs isoformes qui ont probablement des localisations subcellulaires distinctes (Pujol, Bonnerot et al. 2001). Enfin, si les sous-unités « a » ne présentent pas de spécificité tissulaire chez les plantes, elles sont spécifiques de différents compartiments. « VHA-a1 » est ainsi localisée au niveau du TGN alors que « VHA-a2 » et « VHA-a3 » sont préférentiellement associées au tonoplaste (Dettmer, Hong-Hermeszdorf et al. 2006).

4.3.4.1.3 Redondance génétique mais pas forcément redondance fonctionnelle.

Chez la levure, deux sous-unités « a » sont co-exprimées Vph1p et Stv1p (Manolson, Wu et al. 1994). Vph1p est associée aux vacuoles, tandis que Stv1p transite entre le Golgi et les endosomes. Les complexes V-ATPase formés soit avec Vph1p, soit avec Stv1p, présentent des différences en terme couplage et de stabilité de l'association V1 – V0 (Kawasaki-Nishi, Bowers et al. 2001; Kawasaki-Nishi, Nishi et al. 2001), mais ces différences ne semblent pas vitales puisque Vph1p peut remplacer efficacement Stv1p (Perzov, Padler-Karavani et al. 2002). En revanche, les travaux réalisés par le laboratoire d'Andreas Mayer ont permis de mettre en évidence, chez la levure, des spécificités fonctionnelles de Vph1p, si bien que Stv1p ne peut remplacer efficacement Vph1p. Partant de résultats indiquant que le calcium associé à la calmoduline était requis après les SNAREs lors de la fusion des vacuoles de levures (Peters and Mayer 1998), ce laboratoire s'est intéressé à l'existence putative d'un pore de fusion protéique intervenant en aval des SNAREs dans le processus de fusion membranaire (Mayer 2001). Ainsi en 2001 Peters et coll. mettaient en évidence un

processus de fusion médié spécifiquement par les secteurs V0 contenant la sous-unité Vph1p et non ceux contenant la sous-unité Stv1p (Peters, Bayer et al. 2001). Ce processus a été étudié davantage par la suite, permettant de confirmer le rôle du calcium, des SNAREs et les étapes successives de la fusion membranaire au niveau des vacuoles de levure (Muller, Bayer et al. 2002; Bayer, Reese et al. 2003; Muller, Neumann et al. 2003). Ces travaux ont inspiré ce que nous avons réalisé au laboratoire de Michel Labouesse, Samuel Liégeois et moi (cf. partie Résultats). Et nos résultats suggèrent qu'il en va de même dans l'épiderme de *C. elegans* où VHA-5 est la seule sous-unité « a » requise pour une étape tardive de la sécrétion (probablement pour la fusion membranaire) (cf. partie II Résultats : Liégeois et coll., en préparation, (Liegeois, Benedetto et al. 2006)). Enfin, *in vitro*, il est possible d'inhiber la V-ATPase de la bordure dentelée des ostéoclastes sans affecter significativement la V-ATPase lysosomale grâce au composé FR167356 (Niikura, Takano et al. 2004) ce qui renforce l'idée qu'il existe bel et bien au sein d'une même cellule des V-ATPases fonctionnellement distinctes.

4.3.4.1.4 Le cas extrême de la paramécie.

La paramécie étant un protozoaire, la question de la spécificité tissulaire est ici sans objet, pourtant la diversité des sous-unités « a » et probablement des complexes V-ATPases y est extrême, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude des complexes V-ATPase. En effet, il existe chez cet organisme 17 sous-unités « a » classées en 9 groupes et localisées pour le moins à 7 emplacements différents (Wassmer, Kissmehl et al. 2006). Cette grande diversité potentielle de complexes V-ATPases est à mettre en relation avec la complexité du trafic intracellulaire (Allen 2000; Allen and Fok 2000; Kissmehl, Froissard et al. 2002), et les organites spécialisés qui requièrent la V-ATPase, comme les trichocystes (objets d'une exocytose régulée) (Plattner and Kissmehl 2003), les phagosomes/lysosomes (organites de dégradation des bactéries ingérées) (Fok and Allen 1990; Allen and Fok 2000), ou les vacuoles contractiles (Allen 2000; Allen and Naitoh 2002; Gronlien, Stock et al. 2002).

Les trichocystes (Figure 2C) sont des organites assimilables à des granules de sécrétion impliqués dans le harponnage des bactéries dont se nourrit la paramécie. Leur sécrétion est régulée par le calcium et requiert une fonction de fusion membranaire probablement médiée par le secteur V0 de la V-ATPase (Plattner and Kissmehl 2003) (cf. 4.4.4). Le secteur V0 pourrait également être requis pour la maturation des trichocystes plus que pour leur fusion, puisque la biogenèse des trichocystes est plus sévèrement affectée par l'ARNi contre des sous-unités V0 que contre des sous-unités V1 (Wassmer, Froissard et al. 2005).

Les bactéries dont se nourrit la paramécie sont phagocytées et lysées par la fusion de lysosomes avec le phagosome, la V-ATPase est alors requise pour acidifier le lumen de ces

compartiments et permettre leur fusion (Wassmer, Froissard et al. 2005) comme chez les autres organismes (cf. 4.2.3.2).

Concernant maintenant la vacuole contractile (Figure 2B), il s'agit d'un organite complexe formé d'une vacuole prolongée par 5 à 10 invaginations membranaires principales sur lesquelles débouchent des canaux collecteurs en provenance du spongiome. Ce spongiome est soit lisse, soit décoré par la V-ATPase (Fok, Aihara et al. 1995; Fok, Yamauchi et al. 2002). La V-ATPase y est requise pour l'osmorégulation, fonction critique pour un organisme aquatique soumis à un environnement osmotiquement très variable (Stock, Gronlien et al. 2002).

4.3.4.1.5 Une seule sous-unité « a » chez la plupart des mycètes !

Voilà le cas inverse de la situation précédente. En effet une étude récente révèle que chez les mycètes, la levure est un cas particulier, puisque l'énorme majorité d'entre eux dont *Neurospora crassa* ne possèdent qu'une seule sous-unité « a » (Chavez, Bowman et al. 2006). L'existence éventuelle de différents complexes V-ATPase chez ces organismes ne peut donc pas reposer sur les isoformes de sous-unité « a ». En revanche cette étude révèle également que seuls les mycètes possèderaient une sous-unité « c' ».

4.3.4.2 Redondance génétique des autres sous-unités.

4.3.4.2.1 Expression tissu-spécifique de certaines isoformes.

Chez les vertébrés, il existe deux isoformes pour la plupart des sous-unités de V1, et dont l'une des deux présente une répartition tissulaire spécifique tandis que l'autre est généralement ubiquitaire. Ainsi chez le rat, la sous-unité « E2 » est trouvée dans tous les tissus alors que « E1 » est spécifique des testicules (Imai-Senga, Sun-Wada et al. 2002) où elle participe à la V-ATPase qui acidifie spécifiquement l'acrosome des spermatozoïdes (Sun-Wada, Imai-Senga et al. 2002). Chez l'homme, les sous-unités « a4 », « B1 », « G3 » et « C2 » sont spécifiquement exprimées dans les cellules intercalaires du rein où elles participent au complexe de la membrane plasmique apicale (Jouret, Auzanneau et al. 2005). La sous-unité « d2 » des vertébrés présente également une spécificité tissulaire : on la trouve seulement dans la peau, le rein et la moelle osseuse, contrairement à la sous-unité « d1 » ubiquitaire (Smith, Jouret et al. 2005; Sato, Shikano et al. 2006). Ensuite chez *Danio rerio* les sous-unités « B » : vatB1 et vatB2 présentent également des patrons d'expression différents (Boesch, Eller et al. 2003). Enfin, chez les plantes il existe deux sous-unités « A », la sous-unité « A1 » est ubiquitaire, tandis que « A2 » est spécifique des racines et des fruits mûrs (Bageshwar, Taneja-Bageshwar et al. 2005), et de même la sous-unité « E2 » est

ubiquitaire tandis que « E1 » est restreinte aux cotylédons et aux feuilles (Kawamura, Arakawa et al. 2000).

4.3.4.2.2 Localisations subcellulaires spécifiques

La redondance d'isoformes d'une même sous-unité dans un tissu donné s'accompagne souvent d'une spécificité de localisation subcellulaire différente des isoformes. Les sous-unités « E1 » et « a4 » sont par exemple spécifiques des endosomes dans les cellules intercalaires du rein, quand « E2 » est apicale (Paunescu, Da Silva et al. 2004; Jouret, Auzanneau et al. 2005). De même dans ces cellules, la sous-unité « B2 » n'est pas trouvée au niveau des microvilli de la membrane apicale, tandis que « B1 » l'est (Paunescu, Da Silva et al. 2004). La sous-unité « d2 » est quant-à elle spécifiquement trouvée à la membrane apicale dans les cellules intercalaires du rein (associée à « a4 ») et dans les ostéoclastes (associée cette fois à « a3 ») (Smith, Jouret et al. 2005). Ensuite, la sous-unité « D1 » dans l'épididyme de rat présente une localisation particulière à la membrane apicale (Pietrement, Sun-Wada et al. 2006). Dans les neurones de souris, les sous-unités G1 et G2 sont exprimées mais seule la sous-unité G2 est présente dans les vésicules synaptiques (Murata, Sun-Wada et al. 2002). Enfin, la sous-unité « D2 » chez les plantes serait exclue des vacuoles de la feuille (Kawamura, Arakawa et al. 2000)

4.4 Ce n'est pas toujours la pompe qui compte...

Les fonctions de la V-ATPase que j'ai présentées précédemment reposent toutes sur l'activité de la pompe V1 – V0. Or, les interactions que la V-ATPase entretient avec d'autres protéines structurales ou régulatrices présentées dans le paragraphe 5.3 amènent la question de rôles insoupçonnés et sous-estimés de ce complexe, notamment se(s) rôle(s) structural (/aux), et d'autres rôles que je vais aborder plus en détail ci-après. Bien que j'aie choisi de présenter ces autres fonctions dans un second temps, en partie parce qu'elles sont souvent moins bien décrites, il n'est pas évident ni qu'elles soient moins fondamentales pour la vie, ni qu'elles soient plus récemment apparues au cours de l'évolution. Les propriétés du secteur V0 et le fait qu'il possède des fonctions indépendantes de V1, n'excluent pas que ces dernières aient pu apparaître avant celles du complexe V1 – V0.

4.4.1 V-ATPase et vésiculogenèse.

Dans les adipocytes en culture, Malikova et coll. ont montré que le transporteur du glucose GLUT4 (« Glucose Transporter 4 ») s'accumulait au niveau de structures membranaires qui sédimentent très vite (donc de grande taille) lorsque ces cellules sont incubées avec des inhibiteurs de la V-ATPase (Malikova, Shi et al. 2004). Ceux-ci inhibent également la réponse des adipocytes à l'insuline. Ces données furent interprétées comme un défaut de formation des vésicules où GLUT4 s'accumule normalement « en attendant » un stimulus insulinique pour fusionner avec la membrane plasmique. Cela impliquerait un rôle de la V-ATPase dans la vésiculogenèse, qu'il faut peut-être corrélérer avec un rôle d'organisation de microdomaines membranaires (cf. ci-dessus), ou avec le possible rôle d'adaptateur de la sous-unité H avec les complexes AP-2 (cf. ci-après).

4.4.2 L'activité de la V-ATPase est importante pour le trafic cellulaire.

4.4.2.1 V-ATPase et régulation du cholestérol.

Dans différents contextes, il a été montré que la V-ATPase influe sur le trafic du cholestérol. En effet, la bafilomycine A1 qui l'inhibe spécifiquement, perturbe le trafic du cholestérol et des lipoprotéines (Furuchi, Aikawa et al. 1993; Issandou, Guillard et al. 2004; Kruth, Jones et al. 2005). Si certaines études pointent l'importance de la régulation du pH et donc un rôle de la pompe dans ce processus, il est également possible que d'autres fonctions associées à la V-ATPase ou ses sous-unités, soient impliquées. La V-ATPase pourrait être un organisateur de microdomaines membranaires comme les DRMs, et serait ainsi impliquée dans les processus de tri.

4.4.2.2 V-ATPase et fusion cellulaire chez *C. elegans*.

Il a été montré en mai 2005, que la V-ATPase était impliquée dans la répression des événements de fusion cellulaire chez l'embryon de *C. elegans* (Kontani, Moskowitz et al. 2005). Le mutant *fus-1* de la sous-unité « e » a été isolé dans un crible pour des défauts d'hyperfusion des cellules épidermiques. Il s'est avéré que toutes les cellules impliquées dans des fusions au cours du développement embryonnaire exprimaient cette sous-unité. Les mutants *fus-1* sont sauvés par les mutations du facteur de fusion *eff-1*, indiquant que le

rôle de FUS-1 passe par EFF-1. EFF-1 est un fusogène dont la localisation est restreinte aux membranes devant fusionner (Shemer, Suissa et al. 2004; del Campo, Opoku-Serebuoh et al. 2005; Kontani and Rothman 2005). Cependant ce processus de fusion impliquerait la V-ATPase entière puisque les sous-unités de V0 et de V1 semblent également requises pour restreindre la fusion médiée par EFF-1. Les auteurs proposent différentes hypothèses pour expliquer le rôle joué par la V-ATPase. Outre le fait que l'hyperfusion pourrait être un effet indirect, du à un défaut d'acidification, l'importance de la V-ATPase dans le trafic polarisé, sa localisation polarisée à la membrane plasmique et son association préférentielle aux DRMs, suggère que cette pompe pourrait être impliquée dans la restriction d'EFF-1 aux domaines membranaires où les fusions doivent se produire. En l'absence de complexe V-ATPase, EFF-1 se retrouverait délocalisé et provoquerait des fusions ectopiques.

4.4.3 Des rôles de certaines sous-unités indépendamment de leur participation à la pompe ?

4.4.3.1 Sous-unité H et endocytose dépendante d'AP-2 : importance pour le SIDA.

La sous-unité H de la V-ATPase présente des similarités avec les β -adaptines, (Geyer, Fackler et al. 2002). Grâce à ou plutôt à cause de cela, elle peut servir d'adaptateur entre la chaîne $\mu 2$ du complexe adaptateur AP-2 et la protéine Nef des virus HIV (« Human Immunodeficiency Virus ») et SIV(« Simian Immunodeficiency Virus ») pour l'internalisation de ces virus, et favoriser leur infection (Geyer, Yu et al. 2002).

4.4.3.2 Rôle des protéolipides dans le développement des tumeurs.

Dans un article de 2003, il a été montré que les protéolipides de V0 (16 kD et 21 kD : c et c") différemment de la sous-unité A de V1 (70 kD), étaient importants pour la survie et la croissance des cellules HeLa (fibroblastes humains cancéreux) (Zhan, Yokoyama et al. 2003). Il est possible que ce soit la fonction spécifique de V0 (cf. 4.4.4) qui soit ici touchée et explique la différence de comportement entre sous-unités du secteur V0 et du secteur V1.

4.4.3.3 Un rôle spécifique de « D1 » hors du complexe V-ATPase ?

Comme rapporté plus haut, dans l'épididyme de rat, la sous-unité « D1 » présente une localisation à la membrane apicale dans des domaines où les autres sous-unités de la V-

ATPase ne sont pas détectées. Cette observation conduit les auteurs à proposer que « D1 » pourrait y jouer un rôle indépendant de la V-ATPase.(Pietrement, Sun-Wada et al. 2006).

4.4.4 Rôle indépendant du secteur V0 dans la fusion membranaire et la sécrétion.

4.4.4.1 La fusion membranaire.

La fusion entre deux compartiments (vésicule synaptique et membrane plasmique présynaptique, granule de sécrétion et membrane apicale, fusion homotypique des vacuoles de levure, etc.), se décompose en différentes étapes faisant intervenir différentes protéines vues dans la partie 1 : approche, arrimage, amorçage, ancrage, formation d'un « stalk », ouverture d'un pore de fusion, extension du pore de fusion, et fusion complète. De plus, différents modes de fusion ont été rapportés dont des fusions incomplètes/transitoires, baptisées « kiss-and-run » (Artalejo, Elhamdani et al. 1998; Stevens and Williams 2000; Schneider 2001; Tsuboi and Rutter 2003; Wightman and Haynes 2004; Zefirov, Abdurakhmanov et al. 2004; Chen, Xiong et al. 2006; Logiudice and Matthews 2006; Sullivan 2006).

Deux débats majeurs animent actuellement le domaine de la fusion des membranes :

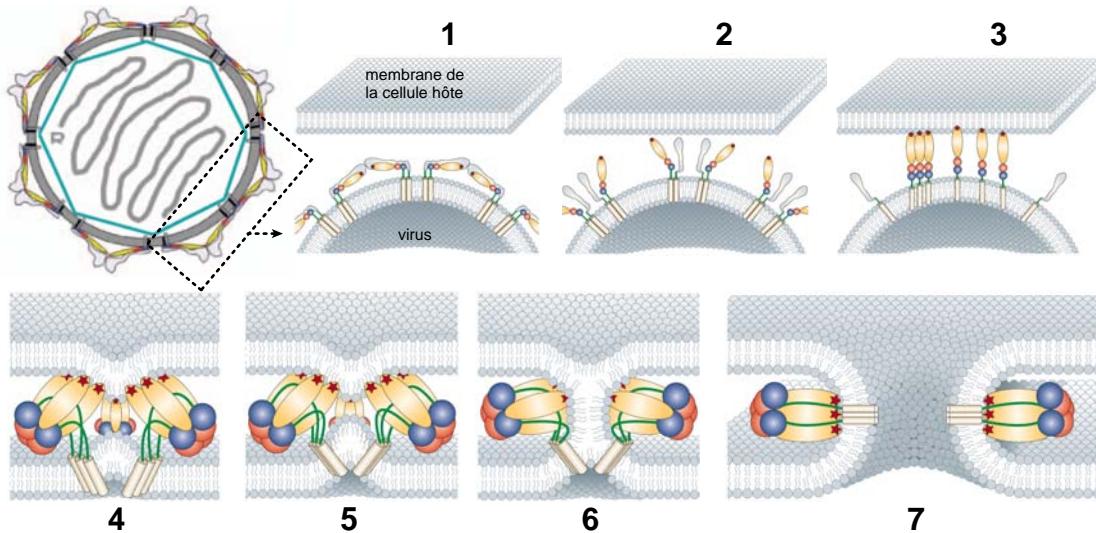
- la fusion fait-elle intervenir un pore protéique, ou un pore lipidique suffit-il ?
- les SNAREs sont-elles nécessaires et suffisantes pour faciliter la fusion *in vivo* ?

4.4.4.1.1 *Pore protéique ou pas ?*

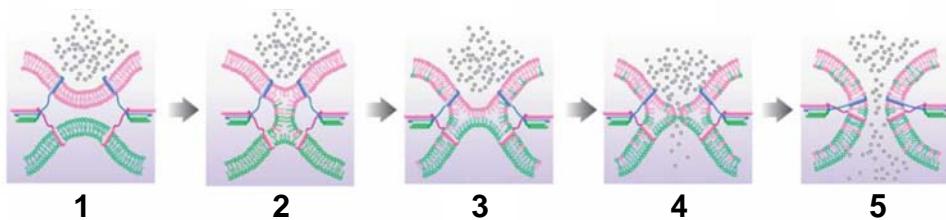
Les seuls événements de fusions clairement médiés par des protéines sont ceux impliquant des protéines virales lors de l'infection par des virus à enveloppe (Durell, Martin et al. 1997; Melikyan and Chernomordik 1997; Basanez 2002; Zaitseva, Mittal et al. 2005) (Figure 50A). En effet dans les autres contextes *in vivo*, les caractéristiques physiques des événements de fusions sont semblables à celles observées *in vitro* en l'absence de protéines, suggérant que ce sont les lipides eux-mêmes qui permettent la fusion et non les protéines (Monck, Oberhauser et al. 1995; Chanturiya, Chernomordik et al. 1997; Lee and Lentz 1997; Cans, Wittenberg et al. 2003). De plus, les deux types de fusion : transitoire et complète sont possibles dans un système purement lipidique (Chizmadzhev, Kumenko et al. 1999). Hors contexte d'infection, les rôles que l'on concédait donc aux protéines se restreignaient à la mise en contact des deux membranes qui nécessite de chasser l'eau piégée entre les deux et de vaincre les forces de répulsion électrostatiques, étape que l'on

Figure 50. FUSIONS MEMBRANAIRES.

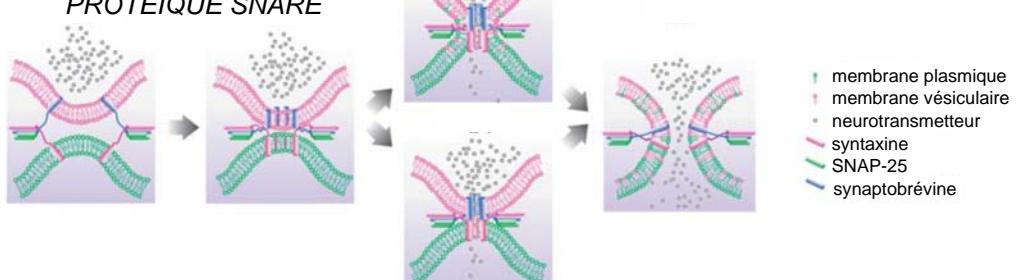
A PROTEINES VIRALES DE CLASSE II



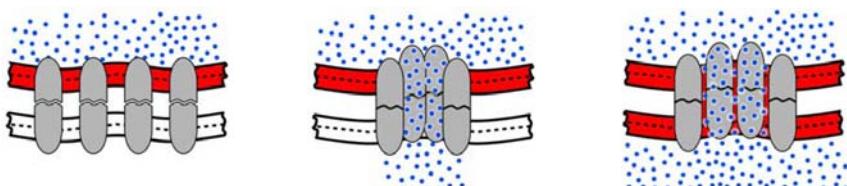
B MODELE DE L'HEMIFUSION IMPLIQUANT LES SNARES



C MODELE DU PORE PROTEIQUE SNARE



D MODELE DU PORE PROTEIQUE V0 - V0



LEGENDE.

A : Modèle de fusion par les protéines virales de classe II. Ce sont les seules protéines à ce jour dont le rôle dans la fusion proprement dite est parfaitement établi.

B : Modèle de fusion médiée par les complexes SNAREs : impliquant un pore lipidique ("Stalk hypothesis") ou protéique.

C : Modèle de fusion médiée par un pore protéique multimérique de type protéolipidique (secteur V0 de la V-ATPase).

pensait limitante pour le processus de fusion . Une fois les intermédiaires de fusion formés, la fusion en tant que telle ne devait pas nécessiter l'intervention de protéines (Zimmerberg and Chernomordik 1999).

Récemment cependant, on a réalisé que la progression de la fusion implique des évènements de plus en plus endergoniques pour culminer au niveau de l'expansion du pore qui est très avide en énergie. Ces observations rendent à présent très probable la nécessité *in vivo* de protéines au moins pour l'extension du pore de fusion dans le cadre de la fusion complète (Cohen and Melikyan 2004). Différents modèles sont actuellement évoqués pour expliquer la fusion complète via l'intervention de protéines. Ces protéines pourraient constituer un manteau qui en imposant une certaine courbure à la membrane forcerait la fusion (Kozlov and Chernomordik 2002), ou bien le pore serait-il formé par une structure protéique ménageant un canal dont les sous-unités en s'écartant permettraient l'intercalation des lipides et l'extension du pore (Mayer 2001). Les observations anciennes par ME après cryofracture de structures protéiques en rosettes aux sites de fusion (Beisson, Lefort-Tran et al. 1976) et plus récentes par l'utilisation de l'AFM (« Atomic Force Microscopy ») ont renforcé cette thèse (Jena 2002; Jena 2003). Cette éventualité est d'autant plus séduisante que dans le cadre de l'exocytose régulée, le calcium et la calmoduline interviennent en aval du processus d'ancre par les SNAREs (Peters and Mayer 1998; Wickner and Haas 2000), suggérant qu'une activité protéique modulé par le calcium et la calmoduline régule effectivement la fusion proprement dite (on ne connaît pas de structures purement lipidiques capables de répondre à ce type de stimulus).

4.4.4.1.2 Les SNAREs nécessaires et suffisantes ?

Selon le modèle SNARE (Figures 14C-D et 50B), les SNAREs sont censées être les protéines impliquées dans le processus de fusion *in vivo* (Jahn and Scheller 2006), et des modèles de fusions cellulaires indiquent qu'elles pourraient aussi bien intervenir dans les évènements de fusion complète que de fusion transitoire (Giraudo, Hu et al. 2005). Si bien que pore protéique ou pas, les SNAREs semblent suffisantes. Les mêmes auteurs que ceux qui ont mis en évidence des structures en rosette au niveau des vésicules synaptique par AFM, proposent d'ailleurs que les SNAREs forment elles-mêmes le pore de fusion (Leabu 2006). Cependant, l'énergie nécessaire à l'extension du pore est incompatible avec le fait que les SNAREs soient les seules protéines impliquées dans ce processus (Montecucco, Schiavo et al. 2005). De plus, la sécrétion régulée par le calcium est possible en l'absence de SNAREs (Dunant and Israel 2000). Enfin, la présence de complexes SNAREs ancrés n'est pas suffisante pour permettre la fusion des vacuoles de levure dépourvues de Vph1p (cf. ci-après) (Bayer, Reese et al. 2003).

4.4.4.2 Le secteur V0 aurait une fonction indépendante et interviendrait dans la fusion en aval de l'ancrage par les SNAREs et de la libération de calcium.

4.4.4.2.1 Le médiatophore.

L'histoire remonte à 1986, quand Israël et coll. ont purifié un complexe appelé médiatophore extrait de l'organe électrique de la torpille (*Torpedo marmorata*), et composé de sous-unités de l'ordre de 16 kD. Des liposomes contenant ce médiatophore et chargés en acétylcholine acquéraient la capacité de libérer l'acétylcholine de façon régulée et dépendante du calcium (Birman, Israel et al. 1986; Israel, Morel et al. 1986). Un peu plus tard le même type d'activité a été détecté dans le cerveau du rat (Israel, Lesbats et al. 1988). Peu après la même équipe identifiait les sous-unités du médiatophores comme les sous-unités « c » du secteur V0 de la V-ATPase (Birman, Meunier et al. 1990). Plus tard les expériences réalisées sur des liposomes furent reproduites dans les ovocytes de xénopé (*Xenopus laevis*) en les faisant exprimer le protéolipide de 15 kD (Leroy, Meunier et al. 1994), et dans une lignée neuronale déficiente pour la sécrétion régulée par le calcium transfectée avec le médiatophore (Falk-Vairant, Correges et al. 1996; Falk-Vairant, Correges et al. 1996), prouvant que ce mécanisme d'exocytose était possible dans les cellules. Les travaux sur le médiatophore ont inspiré des modèles de fusion membranaire basés sur l'association de deux complexes de protéolipides en *trans* (sur chacune des deux membranes impliquées) (Almers and Tse 1990).

4.4.4.2.2 Le secteur V0 impliqué dans la fusion homotypique des vacuoles de levure.

En 2001, l'équipe d'Andreas Mayer chez la levure, a utilisé le modèle de fusion homotypique des vacuoles de levure pour montrer que les complexes V0 de la V-ATPase sont nécessaires aux membranes des deux vacuoles pour autoriser leur fusion *in vitro*, renforçant l'idée de la formation d'un trans-complexe V0-V0 (Peters, Bayer et al. 2001). Il a également été montré que l'association des complexes V0 était dépendante de l'ancrage par les SNAREs, mais que les SNAREs n'étaient plus requises une fois le *trans*-complexe formé ; et aussi, que la calmoduline interagit avec V0 et que l'expansion du pore de fusion est dépendante du calcium et de la calmoduline dans ce système (Peters, Bayer et al. 2001). Cependant, la nécessité d'un gradient de protons établit par la V-ATPase pour la formation des complexes SNAREs (Ungermann, Wickner et al. 1999) complique l'interprétation quant au rôle du secteur V0 dans la fusion. Il a fallu trouver un moyen de découpler l'effet du gradient de protons généré par la V-ATPase et la fusion médiée par le secteur V0.

La levure possède deux sous-unités « a » de V-ATPase : Vph1p et Stv1p. Aucun des deux mutants ne présente de phénotype de pompe défectueuse car les deux sous-unités se compensent l'une l'autre pour cette fonction dans les mutants. En revanche, *vph1* présente

un défaut de fusion des vacuoles que ne présentent ni le mutant *stv1*, ni le mutant le plus sévère de V1 : *vma9* (Bayer, Reese et al. 2003). Ces indications faisaient du secteur V0 contenant Vph1p un candidat pour la participation à un complexe de fusion des vacuoles. En l'absence de V-ATPase chez la levure, la fusion entre deux vacuoles est encore possible grâce un gradient de pH résiduel. Cependant les vacuoles dépourvues de Vph1p, bien que présentant des pH compatibles avec la fusion, sont incapables de fusionner (Bayer, Reese et al. 2003). Inversement les vésicules dépourvues de Stv1p ou de Vma9p restent fusion-compétentes. De plus en utilisant des anticorps dirigés contre la partie cytosolique de Vph1p, Bayer et coll. montrent que seule la fusion des vacuoles est inhibée, tandis que la fonction pompe de la V-ATPase ne l'est pas. Ces anticorps inhibent également la fusion de vésicules dépourvues de V1. L'ensemble de ces expériences montrent clairement que Vph1p est requise pour la fusion indépendamment de son rôle dans la pompe V-ATPase. Enfin, les vacuoles dépourvues de Vph1p et incomptétentes pour la fusion forment des complexes SNAREs ancrés et sont capables de libérer le calcium, indiquant que la fonction V0 dépendante du calcium est bien requise en aval de l'ancrage et de la libération de calcium (Bayer, Reese et al. 2003).

4.4.4.2.3 Confirmation du rôle de V0 dans la fusion membranaire chez la drosophile.

Plus récemment, il a été montré que la sous-unité « a1 » VHA100-1 des neurones de *Drosophila melanogaster* correspond à la sous-unité Vph1p de levure dont elle est capable de sauver le défaut de fusion des vacuoles chez le mutant *vph1* (Hiesinger, Fayyazuddin et al. 2005). En étudiant le recyclage des vésicules présynaptiques grâce au colorant FM1-43, un défaut de fusion des vésicules a été mis en évidence dans les cellules mutantes pour *vha100-1*. Ensuite Hiesinger et coll. ont montré que VHA100-1 se lie aux t-SNAREs syntaxine et SNAP-25, et que VHA100-1 est requise pour un effet dominant négatif de la syntaxine mutée. Ils en ont déduit que VHA100-1 agit en aval des SNAREs (Hiesinger, Fayyazuddin et al. 2005). On peut cependant remarquer que sur la base de cette seule expérience, il est possible que VHA100-1 agisse en parallèle, et d'autre part la relation entre le phénotype du dominant-négatif et la fusion membranaire n'est pas établie. En revanche leurs expériences au niveau des zones actives synaptiques montre clairement que chez les mutants *vha100-1*, le nombre de vésicules qui fusionnent par stimulus est diminué, bien que le nombre de vésicules formées, l'ancrage des vésicules et la libération du calcium soient normaux (Hiesinger, Fayyazuddin et al. 2005). Ces données confirment donc que la sous-unité « a » de la V-ATPase est impliquée dans la fusion membranaire après l'ancrage par les SNAREs.

DEUXIEME PARTIE :

RESULTATS - ARTICLES.

- 1) Des gènes impliqués dans l'osmorégulation et la sécrétion chez *C. elegans*.
- 2) Rôle du secteur V0 de la V-ATPase dans la sécrétion épidermique apicale.
- 3) A la recherche de nouveaux acteurs de la sécrétion épidermique apicale.

1 Des gènes impliqués dans l'osmorégulation et la sécrétion chez *C. elegans*.

1.1 Présentation de l'article 1.

Ce « premier » article représente le travail qui a donné les outils et les idées qui ont permis de réaliser le second article. Il est donc en grande partie antérieur à mon arrivée, et ma contribution y a été moindre que celle de Samuel Liégeois qui a fait le travail le plus lourd de cette étude (la génétique et la microscopie électronique). Pour des raisons stratégiques, nous avons hâté la publication du « second » article, et le premier n'est pas encore publié. Néanmoins, il m'a paru plus logique de le garder en premier. Je résume ici succinctement certains des résultats qui mettent également en relief la continuité entre les articles 1 et 2.

1.1.1 Contexte de l'étude.

Grégoire Michaux avait auparavant caractérisé *che-14* (Michaux, Gansmuller et al. 2000). CHE-14 est l'orthologue de Dispatched chez la drosophile et Disp1 chez les vertébrés. C'est une protéine à 12 domaines transmembranaires de la famille de Patched/Ptc1, qui possède un domaine de reconnaissance des stéroïdes SSD (« Sterol-Sensing Domain ») tout comme Patched/Ptc1, SCAP, SREBP, la Reductase HMGCoA, NPC1 (« Niemann-Pick disease Complex 1 ») (Kuwabara and Labouesse 2002). Chez la drosophile et les vertébrés, Dispatched/Disp1 est impliqué dans le transport des protéines Hedgehog dans les cellules émettrices de ces morphogènes (Burke, Nellen et al. 1999; Ma, Erkner et al. 2002; Tian, Jeong et al. 2005). Chez *C. elegans*, Grégoire a montré que CHE-14 est impliqué dans une étape tardive d'une voie de sécrétion apicale dans les cellules épithéliales (Michaux, Gansmuller et al. 2000).

che-14 est en effet uniquement exprimé dans des tissus épithéliaux du ver : cellules supports gaine et socle des neurones chimiosensoriels, cellules épidermiques hyp7 et seam, utérus, vulve, rectum, et cellule excrétrice. La localisation de CHE-14 est très apicale dans toutes ces cellules, et ponctiforme à la membrane apicale de l'épiderme. Chez les mutants *che-14(e1960)*, *che-14(ok193)*, et *che-14(mc35)*, l'absence de CHE-14 dans la cellule excrétrice entraîne un défaut d'osmorégulation conduisant à la mort ~30% des individus entre les stades L2 et adulte, et caractérisé par un phénotype en bâtonnet (« rod ») qui mime

l'effet d'une ablation de la cellule excrétrice (Nelson and Riddle 1984). De plus, ces mutants présentent des défauts d'incorporation de colorants lipophiles (DiO et Dil) par les neurones chimiosensoriels du fait d'une malformation des cellules supports de ces neurones. Enfin, ils présentent des malformations des alae (plus petites et bicornues), et une accumulation de matériel dense sous la cuticule au niveau des cellules seam (vu en microscopie électronique). Les deux premiers défauts ont donné le nom du phénotype Rdy (« Rod and dye-filling defective »).

Un cible pour obtenir des allèles nuls de CHE-14 et d'éventuels partenaires de CHE-14 dans sa voie de sécrétion, avait été réalisé en parallèle de cette étude. Le cible a été conduit sur des animaux mutagénés au TMP/UV (incubation avec du triméthylpsoralène suivi d'une exposition au rayonnement ultra-violet, pour générer des délétions), et le critère de sélection des mutants d'intérêt était le phénotype Rdy (sélection des individus Rod dans un premier temps, puis marquage au DiO).

Les mutants obtenus à la suite de ce cible en plus de l'allèle de *che-14* (*mc35*), sont présentés dans l'article qui suit.

1.1.2 Obtention de 8 allèles conférant le phénotype Rdy et définissant 5 groupes de complémentation.

Le cible cité plus haut a généré 8 allèles correspondant aux gènes *che-14* (allèle *mc35*, validant le cible), *rdy-1* (allèles *mc37* et *mc38* du gène *vha-5*), *rdy-2* (allèles *mc39* et *mc40* du gène *F53F4.6*), *rdy-3* (*mc41*, non cartographié) et *rdy-4* (allèles *mc42* et *mc43*, non cartographié).

Tous ces nouveaux allèles (*mc35* excepté) induisent à 100% une mort précoce (entre L1 et L3) des larves homozygotes mutantes, sous forme de bâtonnets, ce qui révèle un défaut d'osmorégulation plus sévère que celui des mutants *che-14*. Elles présentent également un défaut total de marquage par les colorants lipophiles des neurones chimiosensoriels, révélant un défaut sévère des organes chimiosensoriels, et probablement des cellules supports. En revanche, l'observation des alae L1 en microscopie électronique a révélé que seuls les mutants *rdy-1*, *rdy-2* et *rdy-3* présentent des défauts à ce niveau, et que seul *rdy-1* présente en L1 des figures d'accumulation de matériel dense dans la cuticule basale.

Les allèles *mc37* à *mc40* ont été cartographiés et les deux gènes concernés (*rdy-1* et *rdy-2*) ont été clonés, leurs produits d'expression localisés, et les phénotypes des mutants caractérisés par les soins de Samuel Liégeois. Ces deux gènes ont donc fait l'objet d'investigations plus poussées. Les allèles *mc41* (*rdy-3*), *mc42* (*rdy-4*) et *mc43* (*rdy-4*) ont

été seulement partiellement cartographiés, et des expériences de complémentation entre *mc42* et *mc43* ont révélé que ces deux allèles affectaient le même gène *rdy-4*.

1.1.3 Une sous-unité de V-ATPase requise dans les cellules épithéliales pour la sécrétion et/ou l'osmorégulation.

1.1.3.1 Localisation de VHA-5.

Samuel a pu montrer que *rdy-1* était le gène *vha-5*, qui encode l'une des sous-unités « a » de la V-ATPase chez *C.elegans*. Comme on l'a vu en introduction, la sous-unité « a » fait partie du complexe V0 de la V-ATPase qui est potentiellement impliqué dans deux fonctions : une fonction spécifique dans la fusion (au sens large) membranaire, et une participation au complexe V-ATPase principalement pour l'osmorégulation.

Grâce à un anticorps et à une fusion traductionnelle fonctionnelle, Samuel a montré que *vha-5* est exprimé dans les cellules gaines des organes chimiosensoriels (ce qui explique le défaut de marquage DiO chez les mutants), dans l'utérus, la vulve, le rectum, la cellule excrétrice (ce qui explique le phénotype Rod chez les mutants), et l'épiderme *hyp7* (ce qui explique les défauts cuticulaires des mutants). D'autre part il a observé que VHA-5 se localisait spécifiquement à la membrane apicale dans ces tissus comme le fait la V-ATPase dans la plupart des cellules épithéliales (cf. introduction).

1.1.3.2 Défauts de *vha-5*.

Avec la précision de la microscopie électronique chez les mutants de *vha-5*, Samuel a pu observer au niveau des amphides des défauts de la matrice extracellulaire que l'on pourrait associer à un défaut de sécrétion, et un élargissement de la poche des amphides potentiellement du à un défaut d'osmorégulation. De plus ces mutants présentent des défauts de morphologie de structures lamellaires possiblement impliquées dans les échanges avec la poche.

Des structures membranaires lamellaires qui s'invaginent à partir de la membrane apicale sont également affectées au niveau de l'épiderme. D'autre part un détachement de la cuticule de l'épiderme, provoqué par l'accumulation de fluide révèle probablement un défaut d'osmorégulation. Par ailleurs, les animaux présentent des défauts frappants de sécrétion épidermique, avec l'accumulation de matériel sombre sous la cuticule et des défauts sévères des alae qui sont parfois complètement absentes.

Au niveau du canal excréteur, son lumen est élargi et la localisation de la V-ATPase est plus diffuse que chez l'animal sauvage, ce qui explique probablement les défauts d'osmorégulation et d'accumulation de fluide dans le cœlome qui conduisent à la mort au stade L1.

Ces observations suggèrent que VHA-5 intervient dans deux fonctions : sécrétion et osmorégulation, et que selon les tissus et les processus concernés, l'une ou l'autre de ces fonctions est requise.

1.1.3.3 VHA-5 et l'actine dans l'épiderme.

Samuel a observé que le patron de localisation de VHA-5 à la membrane apicale se réorganisait avant les mues. L'actine corticale se réorganise également en câbles circonférentiels avant chaque mue (Costa, Draper et al. 1997). A l'aide de lignées transgéniques exprimant un rapporteur ABD ::YFP (Actin Binding Domain ::Yellow Fluorescent Protein) et la protéine de fusion fonctionnelle VHA-5 ::CFP (« Cyan Fluorescent Protein»), j'ai montré *in vivo* que les deux réseaux se réorganisaient simultanément et que les microdomaines contenant VHA-5 ::CFP colocalisaient avec les câbles d'actine, à chaque mue. La coïncidence de ce phénomène avec la mue renforce l'idée un rôle de VHA-5 dans la sécrétion épidermique, même si on en peut exclure que ce soit la pompe entière qui soit requise à ce niveau (cf. partie III Discussion et perspectives).

L'ensemble des observations permet de dire que VHA-5 est impliqué dans deux fonctions cellulaires : sécrétion et osmorégulation, et garde ouverte la possibilité que ces fonctions fassent intervenir deux processus distincts : l'un dépendant de V0 seul pour la fusion apicale de compartiments sécrétoires lors de la sécrétion cuticulaire, et l'autre dépendant de la pompe V-ATPase.

1.1.4 Quels rôles pour les autres RDYs ?

1.1.4.1 RDY-2 une « tétraspanine » spécifique des nématodes impliquée dans la sécrétion et l'osmorégulation.

Le gène *rdy-2* correspond au locus *F53F4.6* qui code pour deux isoformes (longue et courte) d'une petite protéine de fonction inconnue, contenant 4 domaines transmembranaires (TMDs). Aucune des deux isoformes n'est conservée en dehors des nématodes. RDY-2 est exprimée au niveau des cellules support gaines des organes

chimiosensoriels, de la cellule excrétrice, et de l'épiderme *hyp7*, et induit dans ces tissus les mêmes types de phénotypes que *vha-5*. RDY-2 est donc potentiellement impliquée dans la sécrétion et l'osmorégulation.

Pour savoir s'il existe des interactions entre *che-14*, *rdy-2* et *vha-5*, des doubles mutants ont été réalisés, et ont montré que le phénotype de *vha-5* dans l'épiderme (le plus sévère) l'emportait sur les autres (ni effet additif, ni effet synergique), et le double mutant *rdy-2* ; *che-14* (avec un effet additifs des phénotypes) est moins sévère que *vha-5*, suggérant que si les trois gènes interagissent dans l'épiderme, alors *rdy-2* et *che-14* pourraient agir en parallèle et *vha-5* serait en amont. J'ai par ailleurs montré que RDY-2 et CHE-14 s'accumulent dans l'épiderme de mutants hypomorphes de *vha-5* pour la sécrétion, ce qui tend à montrer que *che-14* et *rdy-2* agissent en aval de *vha-5* dans ce tissu pour la sécrétion. En revanche cette relation ne paraît pas conservée dans les cellules gaines des amphides : soit que les mutants hypomorphes ne touchent pas la fonction requise dans ce tissu (qui serait alors davantage liée à l'osmorégulation), soit que les relations entre les trois gènes soit réellement différentes dans ces cellules. De plus, les localisations apicales des protéines CHE-14, VHA-5 et RDY-2 que j'ai observées dans l'épiderme et les cellules gaines des amphides sont partiellement chevauchantes, mais ne sont pas identiques. RDY-2 par exemple apparaît souvent plus apical que VHA-5. Ces données suggèrent qu'au niveau de la membrane apicale ces protéines ségrégent dans différents sous-domaines.

1.1.4.2 *rdy-4* ressemble à *rdy-2*.

Les mutants *rdy-4* (*mc42* et *mc43*) présentent une létalité larvaire de 100% (à la différence de *che-14*) et un canal excréteur de longueur normale mais anormalement élargi, comme *vha-5* et *rdy-2*, et des alae affectées à la manière de *che-14* ou de *rdy-2* (alae aplatis, phénotype moins sévère que *vha-5*). *rdy-4* est donc potentiellement impliqué dans le même type de processus que *rdy-2*.

1.1.4.3 *rdy-3* est différent des autres *rdys* et rappelle le mutant *exc-4*.

Contrairement aux autres mutants, *rdy-3*(*mc41*) n'affecte pas les alae, et présente un défaut de morphogenèse des canaux excréteurs, qui ne s'allongent pas, comme le mutant *exc-4* (Berry, Bulow et al. 2003). Il semble donc que ce gène agisse dans une voie différente de *rdy-2*, *rdy-3*, *che-14* et *vha-5*.

1.2 Article 1 : « Genes required for osmoregulation and apical secretion in *Caenorhabditis elegans* ».

Genes required for osmoregulation and apical secretion in *Caenorhabditis elegans*

**Samuel Liégeois¹, Alexandre Benedetto, Grégoire Michaux², Guillaume Belliard
and Michel Labouesse**

**IGBMC, CNRS / INSERM / ULP
1 rue Laurent Fries, BP.10142
67400 Illkirch, France**

¹ Present address: IBMC, 15 rue René Descartes, F-67000 Strasbourg

² Present address: UMR6061, CS 34317 F-35043 Rennes Cedex

Running title: Control of osmoregulation and secretion

Keywords: *C. elegans*; epithelia; osmoregulation; vesicular traffic; apical membrane; V-ATPase; tetraspan protein; *vha-5*; *rdy-2*

Author for correspondence: Michel Labouesse, lmichel@igbmc.u-strasbg.fr

Tel: (33) 388 653 393; Fax: (33) 388 653 201

ABSTRACT

Few studies have investigated whether there is an interdependence between osmoregulation and vesicular trafficking. We previously showed that in *C. elegans* *che-14* is required for osmoregulation, cuticle secretion and sensory organ development. We report the identification of seven lethal mutants displaying *che-14*-like phenotypes, which define four new genes named *rdy-1* to *rdy-4* (rod-like larval lethality and dye-staining defective). *rdy-1*, *rdy-2* and *rdy-4* mutants affect excretory canal function and cuticle formation. Moreover, *rdy-1* and *rdy-2* mutations reduce the amount of matrix material normally secreted by sheath cells in the amphid channel. In contrast, *rdy-3* mutants have short cystic excretory canals, suggesting that it acts in a different process. We show that *rdy-1* encodes the vacuolar H⁺-ATPase *a*-subunit VHA-5, whereas *rdy-2* encodes a new tetraspan protein. We propose that RDY-1/VHA-5 acts upstream of RDY-2 and CHE-14 during cuticle formation, since it is required for their delivery to the epidermal apical membrane. We also showed that RDY-1/VHA-5 distribution changes prior to molting to parallel that of actin microfilaments. In contrast RDY-1/VHA-5 is largely dispensable for RDY-2 or CHE-14 delivery in sheath cells, suggesting that VHA-5 proton pump function is essential in some tissues and its trafficking function in others.

INTRODUCTION

The ability to control solute and water balance during osmotic challenge is essential for cellular life (YANCEY *et al.* 1982). Most cellular functions, in particular vesicle trafficking, depend on the specific balance of inorganic ions in the cytosol and the lumen. For instance, loss of the yeast endosomal Na⁺/H⁺ exchanger Nhx1 alters cytoplasmic and luminal pH, with profound consequences on the endocytic trafficking pathway (BRETT *et al.* 2005). In *C. elegans*, disruption of the epidermal chloride channel gene *c/h-1* results in a significantly wider body and an abnormal structure of a cuticle specialization called alae, which is secreted by the epidermis (PETALCORIN *et al.* 1999). Conversely, many animals and plants respond to the need to modify their internal ion balance by regulating the trafficking of certain ions transporters, channels and exchangers. For instance, vasopressin triggers the fusion of subapical vesicles containing the aquaporin-2 membrane water channel with the apical plasma membrane of kidney collecting duct principal cells to mediate water excretion (NIELSEN *et al.* 1995; NIELSEN *et al.* 1993). Although vesicle trafficking and osmoregulation are most likely interwoven, few studies have investigated whether there is a genetic basis for this interdependence.

An obvious approach to address this problem is to find mutations that would affect both osmoregulation and trafficking. In contrast to *Saccharomyces cerevisiae* for which a wealth of information on the genetic control of osmoregulation (HOHMANN 2002) or trafficking (SCHEKMAN and Novick 2004) is available, less is known in multicellular organisms. The nematode *Caenorhabditis elegans* provides many powerful experimental advantages for defining evolutionary conserved genes, pathways, and mechanisms that give rise to diverse physiological processes

(JORGENSEN and MANGO 2002). In particular, *C. elegans* has been useful to define genes that contribute to osmotic homeostasis (KAITNA *et al.* 2002; LAMITINA and STRANGE 2005; SOLOMON *et al.* 2004) and trafficking (NURRISH 2002).

We previously found that the *C. elegans* protein CHE-14 is important both for osmoregulation and apical trafficking (MICHAUX *et al.* 2000). A proportion of *che-14* larvae die looking as rods filled with fluid, which resemble larvae observed after laser ablation of the kidney-like excretory cell (NELSON and RIDDLE 1984). In addition, transmission electron microscopy (TEM) reveals that *che-14* mutants accumulate large vesicles in support cells of the amphid sensory organs, and dark material at the apical surface of the epidermis while the cuticle normally secreted apically is much thinner than normal (MICHAUX *et al.* 2000). CHE-14 is homologous to Dispatched (MICHAUX *et al.* 2000), a protein required for the release of the Hedgehog morphogen (BURKE *et al.* 1999).

To address how CHE-14 might affect trafficking and to determine if there is a link between trafficking and osmoregulation, we sought out to identify new genes acting in the same process as *che-14*. Here we report the results of a screen to uncover mutations displaying *che-14*-like phenotypes, which lead to the identification of seven new mutations. They define four genes that we called *rdy-1* to *-4*, one of which corresponds to *vha-5* and codes for one of the four *C. elegans* α subunits of the vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) proton pump complex. The V-ATPase is a multisubunit proton pump complex consisting in two distinct subcomplexes, the cytosolic V1 complex that catalyzes ATP hydrolysis, and the transmembrane V0 complex, to which VHA-5 belongs, that is responsible for proton translocation (NISHI and FORGAC 2002). While the present work reports the actual molecular cloning of

rdy-1 as *vha-5*, we recently used *vha-5* mutations to show in a parallel study that the V0 sector of the V-ATPase is present at the limiting membrane of multivesicular bodies and at epidermis apical membrane, where it allows the release of multivesicular body internal vesicles (LIÉGEOIS *et al.* 2006). In particular, using weak mutations, we could genetically establish that VHA-5 has two distinct and separable functions, one involved in proton pumping within the entire V-ATPase complex, and another involved in trafficking within the V0 complex alone (LIÉGEOIS *et al.* 2006). With this recent work as a background, here we molecularly characterize in parallel the genes *rdy-1/vha-5* and *rdy-2*, investigate their function in sensory organs, and compare the cellular role of *rdy-2* to that of *rdy-1/vha-5* in the epidermis. To extend our previous conclusions about the role of the V0 sector in cuticle secretion (LIÉGEOIS *et al.* 2006), we also examine whether VHA-5 expression changes during molting, as observed for many genes involved in cuticle formation. Finally, we test which gene among RDY-1, RDY-2 and CHE-14 acts upstream of the other in the epidermis and in support cells.

MATERIALS AND METHODS

***Caenorhabditis elegans* strains and maintenance**

C. elegans strains were handled and maintained at 20°C as described previously (BRENNER 1974). The following strains were used: N2 (wild-type); CB4856 (wild-type); RW7000 (wild-type); DH1206, *rme-8(b1023)* I; CB3823, *eDf18/unc-24(e138) dpy-20(e1282)* IV; KK627, *itDf2* V/ *nT1[unc-?(n754) let-?]* (IV;V) ; MT3751, *dpy-5(e61)* I; *rol-6(e187)* II; *unc-32(e189)* III; MT464, *unc-5(e53)* IV; *dpy-11(e224)* V; *lon-2(e678)* X; *sqt-3(sc63) him-5(e1467) unc-76(e911)*; *unc-24(e138) dpy-20(e1282)*; MT5813, *nDf42/ nT1[unc-(n754)]* IV; +/*nT1* V. CB4856 is an isolate from a Hawaiian island that shows a uniformly high density of polymorphisms compared with the reference

	Bristol	N2	strain
(http://genomeold.wustl.edu/projects/celegans/index.php?snp=1)			(Wicks <i>et al.</i> 2001);

RW7000 is a Bergerac strain with a high Tc1 copy number (WILLIAMS *et al.* 1992). Description of other strains, markers and rearrangements can be obtained from WormBase (<http://www.wormbase.org>). Strains carrying genetic markers or deficiencies were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center.

Mutagenesis and identification of *rdy* mutations

We previously described a trimethylpsoralen/UV (TMP/UV) clonal screen (MICHAUX *et al.* 2000), which was based on two steps: (i) identification of F1 plates segregating rod-looking larvae filled with fluid; (ii) staining of fluid-filled larvae that were still touch-sensitive with the lipophilic dye 3, 3'-dioctadecyloxacarbocyanine (DiO) to retain plates in which rod-like larvae failed to stain. Staining with DiO was performed as described before (MICHAUX *et al.* 2000). Out of 13000 haploid

genomes, 19 F1 clones segregated dead rod larvae, among which eight were DiO staining defective including *che-14(mc35)* (MICHAUX *et al.* 2000); larvae with signs of necrosis under DIC optics were discarded. These mutations, which defined four new complementation groups (*rdy-1* through *rdy-4*, for rod-like lethality and dye-filling defect; see below), were out-crossed with N2 at least five times prior to further analyses. Their arrest stage was determined based on the somatic gonad morphology, the migration/division of Pn cells, the division of seam and intestinal nuclei and the appearance of postdeirid neurons.

Strong Ras pathway mutants (*let-60*, *mpk-1*, *let-23*, *sem-5*) also display a rod-like larval lethality (YOCHEM *et al.* 1997). We believe that *rdy* mutations do not affect the Ras pathway, as dying *let-23(sy10)*, *mpk-1(ku1)* and *sem-5(n2019)* larvae could still take up DiO (data not shown).

Genetic mapping and complementation tests

Details about the assignment of *rdy* mutations to four complementation groups corresponding to *rdy-1(mc37)* and *rdy-1(mc38)* (LGIV), *rdy-2(mc39)* and *rdy-2(mc40)* (LGV), *rdy-3(mc41)* (LGIII), *rdy-4(mc42)* and *rdy-4(mc43)* (LGII) and their mapping can be found in the supplementary material.

Transgenesis and complementation rescue

DNA was injected into the syncytial gonads of hermaphrodites using injection mixes that generally contained 10 ng/ μ l construct or 100 ng/ μ l cosmid, 100 ng/ μ l pRF4 as a transformation marker (MELLO *et al.* 1991), plus pBSKII plasmid to bring up total DNA concentration to 200 ng/ μ l. DNA mixes were injected into *rdy-1(mc38)/*

unc-5(e53) or *rdy-2(mc39)/ sqt-3(sc63) him-5(e1467) unc-76(e911)* animals; rescue was judged on the absence of Unc animals in the progeny. For *rdy-1*, we found that *F35H10*, one of the two cosmids in the interval where *rdy-1* was predicted to map, could rescue the lethality of *rdy-1(mc38)*. RNA interference (RNAi) (FIRE *et al.* 1998) against *vha-5/ F35H10.4*, which was known to be expressed in the excretory canal (PUJOL *et al.* 2001) (OKA *et al.* 2001), indicated that *rdy-1* corresponds to *vha-5*. For *rdy-2*, we found that *C50B8*, *F53F4*, and a PCR fragment spanning *F53F4.4* and *F53F4.6* (10785 bp; primers 5'TGCTTCTGCCTCTCATTC and 5'CATTCAGGACGAATACTTCC), but not PCR fragments spanning *F53F4.1* and *F53F4.2* (7773 bp fragment; primers 5'GTCATAACAGCCTAACTAC and 5'GCATTTGTAGTGATTCAAGG) or *F53F4.3* (4331 bp fragment; primers 5'CGATGCTCCAATTAGTAAACC and 5'CTTGCAACACTCGAAAGCTTG), could rescue the lethality of *rdy-2(mc39)*. After digestion of the 10785 bp PCR fragment with *MscI* or *Sall*, and gel-purification, the 6985 bp *Sall*-cut fragment containing only *F53F4.6*, but no the *MscI*-cut fragment containing *F53F4.4*, could rescue the lethality of *rdy-2(mc39)*. We conclude that *rdy-2* corresponds to the predicted gene *F53F4.6*.

RNA interference

Hermaphrodites were injected with double-stranded RNA transcribed with the *mMessage mMachine T3* kit (Ambion) from a PCR fragment obtained with primers (5'aattaaccctcactaaaggGAGCTCTGAAGTCTTGTGG and 5'aattaaccctcactaaaggCAGAACTCAAAAGAAAGAAC; lower case letters correspond to the T3 RNA Pol promoter) located in the 3' end of *vha-5*. It induced a partial L2 larval lethality characterized by rod-like larvae filled with fluid.

DNA Sequencing of *vha-5* and *rdy-2*

Using overlapping PCR reactions, we amplified the entire *vha-5* and *rdy-2* coding sequences, and sequenced fragments bearing a deletion or all fragments for *rdy-2(mc39)*. *vha-5(mc37)* corresponds to a 214 pb deletion, including the genomic positions 2498 to 2711 downstream of the first *vha-5* coding nucleotide; *vha-5(mc38)* corresponds to a 124 pb deletion including the genomic positions 2298 to 2421 downstream of the first *vha-5* coding nucleotide; *rdy-2(mc39)* corresponds to a T:A substitution at position 16382 in the *F53F4* cosmid sequence and is predicted to transform an AGA codon into an opal stop codon; *rdy-2(mc40)* corresponds to a 121 bp deletion including the positions 15506 to 15626 in the *F53F4* cosmid sequence.

RT-PCR in *rdy-2*

To determine the 5' end of *rdy-2* transcripts we used an RT-PCR strategy. Total RNA preparation and RT-PCR were carried out as described before (BOSHER *et al.* 2003). Reverse transcription was initiated either with oligo-dT or 5'ACGTAGAGAAGTGCTCCAAGG, which bridges the final two exons. PCR was done using the primer 5'TACTTCTTCCAAATCTCGACG or a primer corresponding to the sequence of the SL1 spliced leader, and 5'CAATGTGACACAGCTAACTCC (in 4th exon) or the primer used for RT. RT-PCR products were then sequenced.

Fluorescent fusion proteins

Constructs were generated using standard procedures and subsequently transformed into XL1-blue electro-competent bacteria. The rescuing *vha-5::gfp* (pML670) and *vha-5::mrfp* (pML698) constructs are described elsewhere (LIÉGEOIS *et al.* 2006). Substituting the GFP coding sequence with that of CFP (taken from

plasmid pPD136.61; Fire kit) produced the *vha-5::cfp* construct. pML680 (*Ex*[+ Δ Hyp]), carrying a 1542 bp deletion in the presumptive *vha-5* promoter, was obtained by digesting pML670 with *Hind*III and *Avr*II followed by T4 DNA polymerase treatment. Other *vha-5* promoter deletions were obtained by PCR using the primers 5'aaaacgcgtgAGAACTGTGAGAATTCAATC and 5'aaaacgcgtg-AGGTGTTAAAGGCTAACATCTGC (deletion 1493 to 2494; underlined sequence, *Mlu* site), and 5'-aaaacgcgtgACAGTTCTCAATTCATATTGG and 5'-aaaacgcgtg-ATCTCTCTCCTTGTTGCTC (deletion 2482 to 2652) starting from pML670. pML673, encoding a RDY-2::GFP functional fusion protein, was obtained by cloning the promoter and the full-length coding sequence of *F53F4.6* in frame with the GFP coding sequence (primers 5'cccgagctcGACAAGAACGTGTTCGAGC, *Sac*I underlined, and 5'gggttaccAACTTTCACGAGATATGAAGATTA, *Kpn*I underlined) in a modified version of pPD95.75 in which a *Sac*I site had been engineered. Substituting the GFP coding sequence with that of CFP produced the *rdy-2::cfp* construct. A similar strategy was used to generate a *che-14::yfp* construct starting from the previously described *che-14::gfp* construct (MICHAUX *et al.* 2000). To examine the distribution of RDY-2 and CHE-14 mutants in weak *rdy-1* mutants, we co-injected the selection marker pRF4 with the mutant *vha-5(L786S)::mrfp* transgene (at 3 ng/ μ l) (LIÉGEOIS *et al.* 2006) with a *rdy-2::cfp* (at 5 ng/ μ l) and *che-14::yfp* (at 20 ng/ μ l) constructs in *vha-5(mc38)/unc-5(e53)* animals and selected F2 transgenic animals that did not segregate Uncs. To generate the *vha-8::vab-10_{ABD}::yfp* construct, the *vha-8* promoter (primers 5'aaaagtgttaccAAAGTATTGTCCGCAAGGCAC and 5'tcccatgttacc-AGTCGTTAGTGGTTTCCCTG; *Kpn*I underlined) was cloned upstream of a cDNA encoding the first 290 residues of the spectraplakin VAB-10 (BOSHER *et al.* 2003)

fused to the YFP coding sequence in the pPD136.64 vector (Fire kit). This construct and the *vha-5::cfp* plasmid (see above) were co-injected with or without a *dlg-1::rfp* plasmid marking the CeAJ (gift from Dr. Jeff Hardin); at least three animals for each larval stage from more than two independent transgenic lines for each injection mixes were examined and gave identical results.

Microscopy

Differential interference contrast (DIC), transmission electron (TEM), scanning electron (SEM-), and confocal microscopy were performed as described elsewhere (LIÉGEOIS *et al.* 2006). TEM on *rdy* mutants was carried out by picking larvae as soon as signs of rigidity and translucence became apparent, which was less than 32 hours after egg laying. TEM and SEM on adults were done by picking L4 larvae 24 hours prior to fixation. For TEM, 4 *vha-5(mc38)* and 3 *rdy-2(mc39)* animals were observed. For each *vha-5(mc38)* and *rdy-2(mc39)* animals, a set of at least 20 adjacent ultrathin sections from the tip of the head, and at least 3 sections taken in at least three different areas of the body were analyzed. For SEM, 15 animals were observed for the *vha-5(mc38)*; *Ex[pML680]* strain, which all displayed alae defects.

RESULTS

A genetic screen for mutants displaying *che-14*-like phenotypes

che-14 mutants display two phenotypes that are easy to score (MICHaux *et al.* 2000). First, a proportion of *che-14* larvae die looking as rods filled with fluid. This lethality was similar to that observed after laser ablation of the excretory cell (NELSON and RIDDLE 1984). Second, all *che-14* L2 and older larvae display a dye-staining defect of amphid and phasmid chemosensory neurons after incubation with the lipophilic dye DiO. DiO normally stains neuronal cell bodies, provided that their ciliated endings are normal and can get access to the environment through the channel formed by the surrounding socket and sheath cells (PERKINS *et al.* 1986).

To identify essential as well as non-essential genes potentially acting in the same process as *che-14*, we used a two-step clonal strategy with the two criteria described above (**Fig. 1A**). A preliminary account of this screen was reported by (MICHaux *et al.* 2000) to describe the identification of *che-14(mc35)*. We also recovered seven other mutations (not described at the time), named *mc37* to *mc43*. We completed this screen by a closer examination of the cuticle, as *che-14* adults have stunted alae, which are cuticular specializations running along the lateral side of the animal (**Fig. 1B**). We called the genes identified by these mutations *rdy* (for rod-like larval lethality and dye-filling defective). Genetic analysis showed that they define four complementation groups, which mapped onto four chromosomes (see Sup. Mat.). The gene *rdy-3* is defined by a single allele, others by two alleles.

Table 1 and **Fig. 1** present a more detailed account of the defects induced by *rdy* mutations. First, whereas *che-14* mutants display a partial larval lethality, other

rdy mutations induced a fully penetrant lethality during the L1 or L2 larval stages. Since all known *che-14* mutations are strong or null alleles (MICHAUX *et al.* 2000), some essential functions carried by *rdy* genes must be *che-14*-independent. Second, they all displayed a penetrant dye-filling defect in amphids and phasmids, as *che-14* alleles. Third, DIC microscopy suggested that all *rdy* L1 larvae, except *rdy-3(mc41)*, had abnormal alae (**Fig. 1B**); the alae defect of *che-14* larvae was intermediate between those of *rdy-1* and *rdy-2*, those of *rdy-4* larvae was slightly variable but generally like that of *che-14* larvae. In wild-type animals, the excretory cell sends on both sides of the animal long anterior and posterior processes called the excretory canals, which extends until the somatic gonad at the L1 stage and reaches the rectum in L2 larvae. *rdy-1*, *rdy-2* and *rdy-4* mutants had an excretory canal of normal length, but it was abnormally wide and occasionally exhibited swelled areas (**Fig. 1C**). In contrast, *rdy-3(mc41)* larvae had no excretory canal and developed a progressive vacuole at the level of the excretory cell body (**Fig. 1C**; 21 out of 29 had no canal; 6 had a canal extending up to the position of the H2 blast cell and 2 until the position of the V1 blast cell). We thus suggest that *rdy-3* may act in a different process than the other *rdy* genes.

We decided to focus on *rdy-1* and *rdy-2*, which had strong alae phenotypes. Our *rdy-1* and *rdy-2* alleles are strong loss-of-function or null alleles, since their phenotypes did not worsen in *trans* to deficiencies (see Materials and Methods). For simplicity, we will first describe their cloning and then their cellular phenotypes.

RDY-1 corresponds to the V-ATPase a subunit VHA-5

To determine the molecular identity of *rdy-1*, we used a classical strategy combining high-resolution genetic mapping, RNA interference and transgene-mediated

complementation rescue (**Fig. 2A**) (see Materials and Methods). We found that *rdy-1* corresponds to the previously described gene *vha-5* (PUJOL *et al.* 2001) (OKA *et al.* 2001) (**Fig. 2A**). In particular, we found that *rdy-1(mc37)* and *rdy-1(mc38)* are small deletions in *vha-5*, which induce premature stop codons (**Fig. 2B**). This result is consistent both with the nature of the mutagen used (trimethylpsoralen), the genetic tests showing that *mc37* and *mc38* are strong or null alleles (see Supplementary Material), and the absence of wild-type VHA-5 in Western blots of *vha-5(mc38)* animals (LIÉGEOIS *et al.* 2006). Below, we will refer to *rdy-1* as *vha-5*. VHA-5 corresponds to one of the four *C. elegans* large transmembrane subunits of the V-ATPase, the so-called *a* subunit. VHA-5 and the other *a* subunits (UNC-32, VHA-6 and VHA-7) have specific tissue distributions (PUJOL *et al.* 2001) (OKA *et al.* 2001). The V-ATPase is involved in acidification of secretory and endocytic organelles, and is essential for osmoregulation in animal excretory systems (NISHI and FORGAC 2002; SUN-WADA *et al.* 2003). The transmembrane V0 sector, to which VHA-5 belongs, also plays a direct role in trafficking in yeast, *Drosophila* and *C. elegans* (BAYER *et al.* 2003; HIESINGER *et al.* 2005; PETERS *et al.* 2001) (LIÉGEOIS *et al.* 2006).

rdy-2 encodes a four-transmembrane protein of unknown function

Using a similar strategy, we showed that the predicted gene *F53F4.6* could rescue the lethality of *rdy-2(mc39)* larvae (see Materials and Methods and **Fig. 3A**). In particular, we found that the mutation *rdy-2(mc39)* changes the Arg codon 71 into an opal stop codon, whereas *rdy-2(mc40)* is a deletion inducing a frameshift (**Figs. 3BC, Sup Fig. 1**), in agreement with the prediction that both are strong or null alleles (see Supplementary Material). RT-PCR experiments and sequence comparisons, which are further detailed in **Sup. Fig. 1**, suggest that there are two distinct *rdy-2*

transcripts with distinct 5' ends. The long and short *rdy-2* transcripts potentially encode two tetraspan membrane proteins (**Fig. 3D, Sup. Fig. 1**), with predicted N- and C-terminal cytosolic tails. Many nematodes species, including the distant parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Strongyloides stercoralis* (www.nematode.net/blast), encode homologues of the short RDY-2 isoform, but only the closely related *C. briggsae* and *C. remanei* species are predicted to encode homologues of the long RDY-2 isoform (**Sup. Fig. 1B**). It suggests that the short RDY-2 isoform might carry the most important function. Outside of nematodes, there are no RDY-2 homologues. In particular, the sizes and sequences of RDY-2 extracellular and cytosolic loops differ from those of other tetraspan proteins, such as proteolipids, connexins, tetraspanins and claudins. Nonetheless, we note that these well-characterized tetraspan proteins are involved in cell adhesion, membrane integrity, or possibly apical trafficking (CHEONG *et al.* 1999).

***vha-5* and *rdy-2* mutations affect osmoregulation and secretion**

As outlined above, *rdy* mutants share with *che-14* mutants several phenotypes at the level of the dissecting microscope. To determine whether this could also be the case at the subcellular level, we examined *vha-5(mc38)* and *rdy-2(mc39)* larvae by transmission electron microscopy as they were becoming rods.

Excretory cell: In wild-type animals, a system of beaded canaliculi feed into a central apical lumen of the excretory canal (**Fig. 4A**). The canal is surrounded by a basal lamina that it shares with the neighboring epidermis, and it remains in contact with the pseudocoelom. Typically, in *che-14* mutants the excretory canal is poorly attached and frequently has an enlarged transverse section (MICHAUX *et al.* 2000). In agreement with the DIC analysis (Fig. 1) and with the characterization of point

mutations partially affecting the proton pump function of *vha-5* (LIÉGEOIS *et al.* 2006), we found that *vha-5(mc38)* null larvae and to a lesser extent *rdy-2* mutant larvae had an enlarged excretory canal (**Fig. 4**). To complete this ultrastructural analysis, we visualized the V-ATPase in *rdy* mutants by generating a YFP fusion construct for the V1 sector E-subunit called VHA-8 (CHOI *et al.* 2003). While VHA-8::YFP distribution along the excretory canal in *rdy-2* larvae appeared normal, its distribution in *vha-5* null larvae was very diffuse and labeled a much larger area (**Fig. 4B**), which confirms the TEM and DIC findings. This and additional GFP reporters also confirmed that *rdy-3* mutants had no excretory canal, and that the excretory canal of *rdy-4* larvae was not grossly abnormal except for its width (data not shown).

Chemosensory organs: In wild-type animals, the bilateral amphid ciliated neurons go through two consecutive channels made by the amphid sheath and the amphid socket cells (**Fig. 5A**), which are both affected in *che-14* mutants (MICHAUX *et al.* 2000; PERKINS *et al.* 1986). The bilateral amphid sheath cells, as several other sensory neuron sheath cells, contain distinctive parallel membrane lamellae (**Fig. 5B**, right enlargement), which are suspected to play a role in the formation of the large vesicles that are secreted within the amphid pocket and accumulate in *che-14* mutants (PERKINS *et al.* 1986). The content of these vesicles might correspond to the granular electron dense material surrounding the ciliated endings of chemosensory neurons (PERKINS *et al.* 1986) (**Fig. 5D**, enlargement). In *vha-5* null larvae, these lamellae adopted a circular ring-like structure (**Fig. 5C**, arrowheads). At a slightly posterior level, neurons were separated in an abnormally wide and electron-light lumen (**Fig. 5E**), and we noted an absence of granular material around neurons in the amphid pocket (**Fig. 5E**, arrows). Enlargement of the sheath pocket might also reflect an osmoregulation defect. Likewise in *rdy-2* mutant larvae, we could not find

any granular material around neurons, which were also spread out in an abnormally wide electron-light lumen (**Fig. 5F**, arrows). These defects are compatible with a direct or indirect (see discussion) role in secreting the granular material found in the amphid channel, and in controlling osmoregulation in the amphid pocket.

Epidermis: Finally, we examined the epidermis and the cuticle (**Fig. 6A**), which in L1, dauer and adult stages forms alae with contributions from seam cells and the *hyp7* syncytial epidermis (SAPIO *et al.* 2005). Typically, *che-14* mutants have a thinner cuticle and alae. We could detect both epidermal and cuticular defects in *vha-5* null larvae (**Fig. 6AB**), which is consistent with the observations that point mutations partially affecting the trafficking function of VHA-5, but not its proton pump function, had reduced alae and were dumpy (LIÉGEOIS *et al.* 2006). Within the epidermis, we noted that the stacked sheets of membranes, which normally invaginate from the apical membrane, were either reduced in size or disorganized (**Fig. 6A**, arrowhead). Extracellularly, the cuticle had an abnormal structure (**Fig. 6AB**). In some places, dense material accumulated under the cuticle (**Fig. 6B**), while in others the cuticle was not closely apposed to the epidermal apical plasma membrane (**Fig. 6A**, black arrowhead). Its outer surface was wavy instead of flat, it had an irregular thickness, and alae were absent (**Fig. 6B**) (consistent with the DIC phenotype). The apparent separation between the epidermis and the cuticle might reflect an osmoregulation defect; the structural cuticular defects confirm that VHA-5 is required for secretion (LIÉGEOIS *et al.* 2006). The cuticle of *rdy-2* larvae was abnormal too, but not as severely affected: its most distinctive feature was the irregular and generally flattened structure of its alae (**Fig. 6B**).

As in the excretory canal, the V-ATPase E subunit VHA-8 was very diffuse in the epidermis of *vha-5* null mutants (**Fig. 6C**), and failed to form the discrete puncta that normally co-localize with VHA-5 in the wild-type epidermis (LIÉGEOIS *et al.* 2006). These observations are consistent with results obtained in yeast suggesting that the *a* subunit of the V-ATPase is necessary to correctly assemble the V-ATPase complex (NISHI and FORGAC 2002). In contrast, VHA-8 had a normal punctate distribution in the epidermis of *rdy-2* larvae (**Fig. 6C**), suggesting that *rdy-2* is not required for V-ATPase complex formation and/or localization.

VHA-5 and RDY-2 are apical and have overlapping distributions

To further define the role of *rdy-1/vha-5* and *rdy-2*, we determined their expression patterns using functional translational fusions (see **Figs. 2, 3**). Using GFP constructs and antibodies, we previously showed that VHA-5 is expressed in the excretory canal, and the epidermis (LIÉGEOIS *et al.* 2006). We found that *rdy-2* has a very similar distribution as VHA-5 in these tissues. (**Fig. 7A**). Specifically, we saw expression in the lining of the excretory canal and excretory duct, but not around the excretory pore. As no expression was seen around the excretory cell body, we conclude that RDY-2 is localized at the apical side of the canal, as reported for VHA-5 (LIÉGEOIS *et al.* 2006). RDY-2 had a similar distribution in the epidermis as VHA-5 and was also excluded from seam cells (**Fig. 7A**). In contrast to VHA-5, whose expression was observed throughout development, starting at mid-embryogenesis, RDY-2 expression became progressively fainter after the L1 stage. VHA-5 was also detected at the lumen of the vulva and rectum (data not shown). In addition, we found that VHA-5 as well as RDY-2 were expressed in the sheath cells associated with head and tail sensory organs (**Fig. 7A**). 3D-reconstructions showed that VHA-5

and RDY-2 formed a six-fold symmetrical pattern, which includes a larger spot that presumably corresponds to the amphid (**Fig. 7C**). We thus suggest that RDY-2 and VHA-5 are present in CEP and/or OLQ support cells, in addition to amphid support cells. In the amphid sheath cell, VHA-5 and RDY-2 were found in the most distal part of the cell lining the sheath pocket, which can be equated to its apical side (**Fig. 7A, D**). Expression in the excretory system, sheath cells and in the epidermis matches well *vha-5* and *rdy-2* phenotypes, suggesting that these genes act cell-autonomously.

***vha-5* acts upstream of *che-14* and *rdy-2* in epidermal but not in sheath cells**

Our initial goal was to identify genes acting in the same process as *che-14* in osmoregulation and trafficking. To test if this was the case for *vha-5*, *rdy-2* and *che-14*, we reasoned that they should at a minimum have the same subcellular distributions and possibly be mutually required for their localization. We generated a triple transgenic line expressing functional VHA-5::mRFP, RDY-2::CFP and CHE-14::YFP constructs. 3D-reconstructions through the head showed that CHE-14 was uniquely present in socket cells (green area in **Fig. 7D**). This observation, along with the absence of RDY-2 and VHA-5 from seam cells, indicates that CHE-14 can work independently of VHA-5 and RDY-2 at least in some cells. We noticed that RDY-2 was enriched in the anterior- and posterior-most areas of the amphid sheath cell surrounding the sheath pocket compared to CHE-14 or VHA-5 (YZ sections of **Fig. 7D**); the significance of this enrichment is unclear.

We next looked at the distribution of the corresponding transgenes in a weak *vha-5* mutant background, which was obtained by rescuing the *vha-5(mc38)* null mutant with a *vha-5* transgene carrying the point mutation L786S. This mutation affects the trafficking function of VHA-5, causing the fusion protein and some cargoes

to accumulate within dark multivesicular bodies in the epidermis (LIÉGEOIS *et al.* 2006). We found that CHE-14 and RDY-2 colocalized with the mutant VHA-5 in the epidermis (**Fig. 7B**), presumably within multivesicular bodies. We conclude that VHA-5 is required for a late trafficking step of CHE-14 and RDY-2 in the epidermis. In contrast, the distributions of the three proteins in sensory organs was overall quite similar to that observed in control heterozygous animals (**Fig. 7D**). In particular, we did not detect their accumulation in areas distal to the sheath pocket. Moreover, *vha-5(mc38)* adults rescued by the trafficking mutant transgenes *vha-5(L786S)* or *vha-5(E830Q)* could normally take up DiO (data not shown). Together these data suggest that the trafficking function of VHA-5 is not essential in amphid sheath cells.

VHA-5 and actin microfilaments are jointly reorganized during molting

The ultrastructural analysis described above show that strong or null mutations in *vha-5* and *rdy-2* affect cuticle secretion. Although they are consistent with previous conclusions based on the analysis of weak *vha-5* alleles (LIÉGEOIS *et al.* 2006), we wished to ensure that the cuticle defects observed in *vha-5* null mutants are not due to early larval lethality. Two observations suggest that it is not the case. First, a mosaic analysis showed that lethality is primarily due to *vha-5* function in the excretory system (**Sup. Table 1**). Second, we could still observe cuticle and alae defects after specific rescue of VHA-5 function in the excretory cell (**Sup Fig. 2**).

The finding that VHA-5 is required for cuticle formation prompted us to examine whether its expression changes during larval molts, as observed for many genes involved in cuticle formation. This is for example the case for cuticle collagens, whose expression is cyclical and peaks prior to molting (JOHNSTONE 2000), for the

other cuticle component QUA-1 (HAO *et al.* 2006), and also for collagen processing enzymes such as cathepsin (HASHMI *et al.* 2004). We did not see any major change in VHA-5 abundance during larval stages (not shown), however we could see that its distribution changed from randomly organized spots at intermolts to aligned spots forming parallel circumferential bands at molts (**Fig. 9** and data not shown). These circumferential bands were strikingly reminiscent of the actin bundles, which disappear after molts and reform prior to molts (COSTA *et al.* 1997). Interestingly, the V1 sector B and C subunits of the V-ATPase can bind actin (LEE *et al.* 1999).

To test whether VHA-5 distribution might follow that of actin, we generated a probe to visualize actin *in vivo*. We fused the first 290 residues of the spectraplakin VAB-10 to YFP (BOSHER *et al.* 2003), since the corresponding domain in human and *Drosophila* VAB-10 homologues is a well-defined actin-binding domain (LEE and KOLODZIEJ 2002; SUN *et al.* 2001). This construct, which was driven by the *vha-8* promoter, is described as ABD::YFP in **Fig. 9** (it was validated as an actin-binding protein using an embryonic epidermal promoter; Landmann, Gally and Labouesse, unpublished results). We could thereby correlate changes in actin organization with that of a VHA-5::CFP construct. Consistent with the findings reported by Costa and coworkers (COSTA *et al.* 1997), we observed that actin distribution was disorganized between molts and started to form parallel circumferential filaments slightly before molts (**Fig. 9**). VHA-5 distribution did not correlate with actin between molts, although we assume that the randomly distributed puncta remain linked to the apical plasma membrane (LIÉGEOIS *et al.* 2006). Interestingly, however, at molting VHA-5 puncta became aligned along ABD::YFP-decorated actin bundles and colocalized with them. We conclude that there is a close relationship between secretion of a new cuticle, actin remodeling and VHA-5-containing V-ATPase distribution.

DISCUSSION

Our initial goal was to identify genes acting in the same process as the sterol-sensing domain protein CHE-14 during exocytosis to the apical membrane and/or osmoregulation (MICHAUX *et al.* 2000). The screen identified seven mutations defining four new genes, which share several features with *che-14*, including the larval lethality, the failure to uptake lipid dyes such as DiO in chemosensory neurons, and for six of them an abnormal cuticle. While mutations displaying a single of these phenotypes may affect osmoregulation or secretion in a very indirect manner, we anticipated that identifying mutations that combine all three phenotypes should identify genes that play a direct role in osmoregulation and/or secretion. For instance, strong alleles in the Ras pathway lead to rod-like larval lethality because the excretory duct cell adopts another fate (YOCHEM *et al.* 1997), but such dying larvae can still take up DiO (see Materials and Methods). Likewise, a search in WormBase (www.wormbase.org, release WS160) for genes giving Dpy or Mlt (indicative of cuticle defect), Clr (indicative of an osmoregulation defect) and larval lethality phenotypes after RNAi identifies only two hits, one of which is *vha-6*; this gene encodes an intestinal V0 a subunit more than 65% similar to *vha-5* at the nucleotide level such that short *vha-6* siRNA species might indirectly target *vha-5*. Consistent with the screen being specific, RDY-1/VHA-5 and RDY-2, which we further studied, are like CHE-14 transmembrane proteins found at the apical pole of the three cell types affected in mutants, namely the epidermis, the excretory cell and support cells.

Despite their phenotypic similarities, there are some notable differences between *che-14* and *vha-5* or *rdy-2* indicating that they may not act in the same pathway in all cells. First, *che-14* mutations induce a partial lethality (MICHAUX *et al.*

2000), whereas the latter induce complete lethality. Second, large vesicles accumulate in chemosensory sheath cells and amorphous material in the seam cells of *che-14* mutants (MICHAUX *et al.* 2000; PERKINS *et al.* 1986), which we did not observe in *vha-5* or *rdy-2* mutants. Lastly, CHE-14 is uniquely present in seam cells and socket cells (MICHAUX *et al.* 2000). The gene *rdy-3* appears unique in our collection, since it was required for excretory canal formation but not for cuticle assembly. Future work should tell whether *rdy-3* acts primarily to allow excretory lumen extension, as the chloride channel EXC-4 (BERRY *et al.* 2003), or if it also controls osmoregulation.

VHA-5 exerts different functions in different tissues

Our molecular identification of *rdy-1* establishes that it corresponds to *vha-5*, which encodes an α subunit of the V0 sector of the V-ATPase. The V-ATPase has long been known to represent the main enzymatic complex regulating the pH of internal organelles along the endocytic and secretory pathways (NISHI and FORGAC 2002). It is also essential to maintain osmoregulation in animal excretory systems (SUN-WADA *et al.* 2003), which is entirely consistent with the observation that *vha-5* is expressed in the excretory cell and that its absence leads to dead larvae (see further below). Our recent genetic analysis of *vha-5* function in the epidermis (LIÉGEOIS *et al.* 2006) strongly suggests that VHA-5 has also a direct role in secretion. Likewise, biochemical and genetic analysis in yeast and *Drosophila* have suggested that the transmembrane V0 sector of the V-ATPase has also a role in membrane fusion, independently from the cytosolic V1 sector and proton pumping (BAYER *et al.* 2003; HIESINGER *et al.* 2005; PETERS *et al.* 2001).

Three observations reported in the present work further strengthen the notion that the V0 sector has a direct role in cuticle secretion. First, the null allele *vha-5(mc38)* prevents alae formation, which corroborates previous conclusions (LIÉGEOIS *et al.* 2006) based on the analysis of weak alleles. Second, a promoter deletion in a *vha-5* transgene, which rescued larval lethality but prevented expression in the adult epidermis, still induced severe cuticle defects, showing that the absence of alae in *vha-5* null larvae is not an indirect consequence of larval lethality. Third, VHA-5 colocalized with actin microfilaments at the apical surface just prior to molting, suggesting that VHA-5 must form well-organized apical circumferential belts when the bulk of cuticle secretion is at its peak. Actin plays probably multiple, both inhibitory and activatory, roles in exocytosis, including a role in positioning exocytic vesicles (EITZEN 2003). In this framework, we suggest that the V-ATPase subunits B and C, which can bind actin (LEE *et al.* 1999), recruit the V0 sector when actin microfilaments get reorganized ahead of molting to position the V0 sector in circumferential stripes, and can subsequently dissociate from the V0 sector, as observed during *Manduca sexta* molting (SUMNER *et al.* 1995). In turn, we suggest that the V0 sector mediates the secretion of specific cuticle components and thereby contributes to cuticle assembly with its characteristic circumferential annulae. Actin might for instance play a role in positioning or allowing the fusion of multivesicular bodies (MVB), which we showed to play a key role in cuticle formation (LIÉGEOIS *et al.* 2006). The observation that VHA-5 is necessary to target RDY-2 and CHE-14 to the epidermal plasma membrane (**Fig. 7B**) predicts that they should act downstream of VHA-5 in cuticle formation, if they indeed act in the same process. It also suggests that CHE-14 and RDY-2 reach the apical epidermal plasma membrane through MVBs, as previously reported for WRT-2 and WRT-8 (LIÉGEOIS *et al.* 2006).

Two of the phenotypes observed by transmission electron microscopy in neuron-associated sheath cells are similar to those observed in epidermal cells of *vha-5* null larvae. In both cell types, specialized membrane stacks were disorganized and secretion was affected: the granular material surrounding ciliated dendrites was strongly reduced or absent, much like alae were absent and the cuticle abnormal. A key question is whether the secretion defects in sheath cells are due to VHA-5 osmoregulation and pH pumping functions or whether it reflects its direct role in secretion, as in the epidermis. We would argue that it primarily reflects a proton pumping function, since the *vha-5* point mutation L786S, which affects secretion in the epidermis but not osmoregulation (LIÉGEOIS *et al.* 2006), could normally take up DiO and did not affect RDY-2 or CHE-14 distribution in sheath cells. If this interpretation is correct, it would indicate that the membrane stacks in sheath cells could have a role in osmoregulation rather than in a secretory process as once suspected (PERKINS *et al.* 1986). They could increase the membrane surface for ion exchange as observed in the kidney.

As discussed above, our data thus suggest that VHA-5 trafficking function is central in the epidermis and its osmoregulation function is central in support cells. However, we do not exclude that VHA-5 also has a minor trafficking role in sheath cells, and conversely that proton pumping across the epidermal apical membrane by the entire V-ATPase also contributes to epidermal homeostasis. As in support cells, membrane stacks, which are abnormal in *vha-5* mutants (**Fig. 6**) and where the V-ATPase is present (CHOI *et al.* 2003; LIÉGEOIS *et al.* 2006), could correspond to an osmoregulatory structure. Acidification of the extracellular matrix might facilitate the activity of collagen pro-convertases. Interestingly, in many transporting epithelia and in vertebrate osteoclasts, whose main function is to resorb bone collagens, the V-

ATPase is enriched at the level of mitochondria-rich membrane invaginations (for review, see (BROWN and BRETON 1996; JURDIC *et al.* 2006)).

The tetraspan protein RDY-2 has a minor role in secretion

We have shown that RDY-2 is a novel tetraspan protein with no homology outside of the nematode genus. The main phenotype of *rdy-2* mutants is an apparent osmoregulation defect, which is similar, albeit slightly less severe, to that of *vha-5* mutants. In addition, we observed that alae were flattened and that the amount of granular material around sensory dendrites was reduced, indicating that its secretion is also impaired. The RDY-2 protein appeared enriched at the apical membrane, which is compatible with a possible role in apical secretion. However the absence of clear homology makes it difficult to suggest how it might act molecularly. Other well-characterized tetraspan proteins may provide some clues. Claudins within tight junctions and connexin 32 within gap junctions are involved in cell-cell adhesion, tetraspanins have multiple roles including cell adhesion and membrane integrity, and the small V0 sector c-subunits are proteolipid tetraspan proteins (BRONSTEIN 2000; NISHI and FORGAC 2002). The apical localization of RDY-2 makes it unlikely that it acts in cell adhesion and there was no apparent membrane integrity defect in *rdy-2* mutants. More interestingly, several tetraspan proteins, such as synaptophysin, synaptoporin, synaptogyrin, MAL/VIP17, have been involved in vesicle formation or delivery (CHEONG *et al.* 1999; HUBNER *et al.* 2002).

Our preliminary characterization of *rdy-4*, which also has flattened alae, raises the possibility that it might act like *rdy-2*. Further characterization of these two genes should define their precise role in epithelial homeostasis and whether they have, as VHA-5, a direct role in secretion.

Genetic analysis of genes involved in osmoregulation

Our screening procedure brought the identification of several genes required for osmoregulation. The finding of a V-ATPase subunit among *rdy-* genes is not surprising, since mutations in the human genes encoding the V1 sector B subunit and one of the V0 sector α subunits result in a renal acidification defect, leading to metabolic acidosis (KARET *et al.* 1999; SMITH *et al.* 2000; WAGNER *et al.* 2004), while the excretory cell is considered as the kidney-like organ of the animal (NELSON and RIDDLE 1984). In addition, loss of this B subunit also leads to sensorineural deafness (KARET *et al.* 1999; SMITH *et al.* 2000), which is presumably linked to a role of the V-ATPase in maintaining the pH of the fluid that surrounds the mechanosensory hair cells (KARET *et al.* 1999). By analogy, it supports our proposal that the enlargement of the sheath pocket surrounding chemosensory neurons observed in *vha-5* null mutants reflects a role of the V-ATPase in maintaining a pH balance in the sheath pocket. Defects in pH maintenance might in turn explain why chemosensory neurons fail to uptake the lipid dye DiO. In organisms that need to rapidly adapt to a changing environment, such as frogs, the V-ATPase plays a key role in maintaining the acid-base balance necessary for Na^+ uptake in a process that involves hyperpolarization of the external plasma membrane (EHRENFELD and KLEIN 1997). The free-living nematode *C. elegans* certainly falls in the category of organisms exposed to a rapidly changing environment, which could explain the prominent requirement for the V-ATPase in the excretory cell and epidermis. Our screening strategy and the fact that *vha-5* and *rdy-2* were subsequently found in the excretory system make it quite likely that *rdy-4* also functions in the excretory cell to control osmoregulation.

The V-ATPase is an electrogenic H^+ pumps that can energize membranes by the voltage component of the proton-motive force rather than by an ionic gradient

(WIECZOREK *et al.* 1999). As such, it influences both osmoregulation in excretory systems, as well as in the secretory and endocytotic pathways. A few other channels and transporters also contribute to both functions, such as chloride channels and sodium/proton antiporters (MARSHANSKY *et al.* 2002). In *C. elegans* for instance, the intracellular chloride channel EXC-4 is required for extension of the excretory canal lumen by the fusion of smaller vesicles (BERRY *et al.* 2003). The *exc-4* phenotype and the finding that the V0 sector of the V-ATPase promotes membrane fusion in such different systems as yeast vacuoles, *Drosophila* synapses, and the *C. elegans* epidermis, raise the idea that the relationships between ion pump/transporters and membrane fusion are more promiscuous than could have been predicted.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Anne Gansmuller at the IGBMC Imaging Facility for help with electron microscopy. We thank Andy Fire, Yuji Kohara, Jeff Hardin and the CGC for reagents. SL and AB were supported by fellowships from the Ministère de la Recherche, and from the FRM. This work was supported by funds from the CNRS, INSERM, and by a grant from the Ministère de la Recherche (programme ACI).

REFERENCES

- BAYER, M. J., C. REESE, S. BUHLER, C. PETERS and A. MAYER, 2003 Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca²⁺-releasing channel. *J Cell Biol* **162**: 211-222.
- BERRY, K. L., H. E. BULOW, D. H. HALL and O. HOBERT, 2003 A *C. elegans* CLIC-like protein required for intracellular tube formation and maintenance. *Science* **302**: 2134-2137.
- BOSHER, J. M., B. S. HAHN, R. LEGOUIS, S. SOOKHAREEA, R. M. WEIMER *et al.*, 2003 The *Caenorhabditis elegans* vab-10 spectraplakin isoforms protect the epidermis against internal and external forces. *J Cell Biol* **161**: 757-768.
- BRENNER, S., 1974 The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
- BRETT, C. L., D. N. TUKAYE, S. MUKHERJEE and R. RAO, 2005 The yeast endosomal Na⁺K⁺/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* **16**: 1396-1405.
- BRONSTEIN, J. M., 2000 Function of tetraspan proteins in the myelin sheath. *Curr Opin Neurobiol* **10**: 552-557.
- BROWN, D., and S. BRETON, 1996 Mitochondria-rich, proton-secreting epithelial cells. *J Exp Biol* **199**: 2345-2358.
- BURKE, R., D. NELLEN, M. BELLOTTO, E. HAFEN, K. A. SENTI *et al.*, 1999 Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* **99**: 803-815.
- CHEONG, K. H., D. ZACCHETTI, E. E. SCHNEEBERGER and K. SIMONS, 1999 VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6241-6248.

- CHOI, K. Y., Y. J. JI, B. K. DHAKAL, J. R. YU, C. CHO *et al.*, 2003 Vacuolar-type H+-ATPase E subunit is required for embryogenesis and yolk transfer in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **311**: 13-23.
- COSTA, M., B. W. DRAPER and J. R. PRIESS, 1997 The role of actin filaments in patterning the *Caenorhabditis elegans* cuticle. *Dev Biol* **184**: 373-384.
- EHRENFELD, J., and U. KLEIN, 1997 The key role of the H+ V-ATPase in acid-base balance and Na+ transport processes in frog skin. *J Exp Biol* **200**: 247-256.
- EITZEN, G., 2003 Actin remodeling to facilitate membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* **1641**: 175-181.
- FIRE, A., S. XU, M. K. MONTGOMERY, S. A. KOSTAS, S. E. DRIVER *et al.*, 1998 Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- HAO, L., K. MUKHERJEE, S. LIEGEOIS, D. BAILLIE, M. LABOUESSE *et al.*, 2006 The hedgehog-related gene qua-1 is required for molting in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn* **235**: 1469-1481.
- HASHMI, S., J. ZHANG, Y. OKSOV and S. LUSTIGMAN, 2004 The *Caenorhabditis elegans* cathepsin Z-like cysteine protease, Ce-CPZ-1, has a multifunctional role during the worms' development. *J Biol Chem* **279**: 6035-6045.
- HIESINGER, P. R., A. FAYYAZUDDIN, S. Q. MEHTA, T. ROSENmund, K. L. SCHULZE *et al.*, 2005 The v-ATPase V0 subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*. *Cell* **121**: 607-620.
- HOHMANN, S., 2002 Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.

- HUBNER, K., R. WINDOFFER, H. HUTTER and R. E. LEUBE, 2002 Tetraspan vesicle membrane proteins: synthesis, subcellular localization, and functional properties. *Int Rev Cytol* **214**: 103-159.
- JOHNSTONE, I. L., 2000 Cuticle collagen genes. Expression in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Genet* **16**: 21-27.
- JORGENSEN, E. M., and S. E. MANGO, 2002 The art and design of genetic screens: *caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Genet* **3**: 356-369.
- JURDIC, P., F. SALTEL, A. CHABADEL and O. DESTAING, 2006 Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol* **85**: 195-202.
- KAITNA, S., H. SCHNABEL, R. SCHNABEL, A. A. HYMAN and M. GLOTZER, 2002 A ubiquitin C-terminal hydrolase is required to maintain osmotic balance and execute actin-dependent processes in the early *C. elegans* embryo. *J Cell Sci* **115**: 2293-2302.
- KARET, F. E., K. E. FINBERG, R. D. NELSON, A. NAYIR, H. MOCAN et al., 1999 Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet* **21**: 84-90.
- LAMITINA, S. T., and K. STRANGE, 2005 Transcriptional targets of DAF-16 insulin signaling pathway protect *C. elegans* from extreme hypertonic stress. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: C467-474.
- LEE, B. S., S. L. GLUCK and L. S. HOLLIDAY, 1999 Interaction between vacuolar H(+)-ATPase and microfilaments during osteoclast activation. *J Biol Chem* **274**: 29164-29171.
- LEE, S., and P. A. KOLODZIEJ, 2002 The plakin Short Stop and the RhoA GTPase are required for E-cadherin-dependent apical surface remodeling during tracheal tube fusion. *Development* **129**: 1509-1520.

- LiÉGEOIS, S., A. BENEDETTO, J. M. GARNIER, Y. SCHWAB and M. LABOUESSE, 2006 The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **173**: 949-961.
- MARSHANSKY, V., D. A. AUSIELLO and D. BROWN, 2002 Physiological importance of endosomal acidification: potential role in proximal tubulopathies. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **11**: 527-537.
- MELLO, C. C., J. M. KRAMER, D. STINCHCOMB and V. AMBROS, 1991 Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *Embo J* **10**: 3959-3970.
- MICHAUX, G., A. GANSMULLER, C. HINDELANG and M. LABOUESSE, 2000 CHE-14, a protein with a sterol-sensing domain, is required for apical sorting in *C. elegans* ectodermal epithelial cells. *Curr Biol* **10**: 1098-1107.
- NELSON, F. K., and D. L. RIDDLE, 1984 Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery. *J Exp Zool* **231**: 45-56.
- NIELSEN, S., C. L. CHOU, D. MARPLES, E. I. CHRISTENSEN, B. K. KISHORE *et al.*, 1995 Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1013-1017.
- NIELSEN, S., S. R. DIGIOVANNI, E. I. CHRISTENSEN, M. A. KNEPPER and H. W. HARRIS, 1993 Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 11663-11667.
- NISHI, T., and M. FORGAC, 2002 The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 94-103.
- NURRISH, S. J., 2002 An overview of *C. elegans* trafficking mutants. *Traffic* **3**: 2-10.

- OKA, T., T. TOYOMURA, K. HONJO, Y. WADA and M. FUTAI, 2001 Four subunit a isoforms of *Caenorhabditis elegans* vacuolar H⁺-ATPase. Cell-specific expression during development. *J Biol Chem* **276**: 33079-33085.
- PERKINS, L. A., E. M. HEDGECOCK, J. N. THOMSON and J. G. CULOTTI, 1986 Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **117**: 456-487.
- PETALCORIN, M. I., T. OKA, M. KOGA, K. OGURA, Y. WADA *et al.*, 1999 Disruption of *clh-1*, a chloride channel gene, results in a wider body of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* **294**: 347-355.
- PETERS, C., M. J. BAYER, S. BUHLER, J. S. ANDERSEN, M. MANN *et al.*, 2001 Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* **409**: 581-588.
- PUJOL, N., C. BONNEROT, J. J. EWBANK, Y. KOHARA and D. THIERRY-MIEG, 2001 The *Caenorhabditis elegans unc-32* gene encodes alternative forms of a vacuolar ATPase a subunit. *J Biol Chem* **276**: 11913-11921.
- SARIO, M. R., M. A. HILLIARD, M. CERMOLA, R. FAVRE and P. BAZZICALUPO, 2005 The Zona Pellucida domain containing proteins, CUT-1, CUT-3 and CUT-5, play essential roles in the development of the larval alae in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **282**: 231-245.
- SCHEKMAN, R., and P. NOVICK, 2004 23 genes, 23 years later. *Cell* **116**: S13-15, 11 p following S19.
- SMITH, A. N., J. SKAUG, K. A. CHOATE, A. NAYIR, A. BAKKALOGLU *et al.*, 2000 Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nat Genet* **26**: 71-75.

SOLOMON, A., S. BANDHAKAVI, S. JABBAR, R. SHAH, G. J. BEITEL *et al.*, 2004

Caenorhabditis elegans OSR-1 regulates behavioral and physiological responses to hyperosmotic environments. *Genetics* **167**: 161-170.

SUMNER, J. P., J. A. DOW, F. G. EARLEY, U. KLEIN, D. JAGER *et al.*, 1995 Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits. *J Biol Chem* **270**: 5649-5653.

SUN, D., C. L. LEUNG and R. K. LIEM, 2001 Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. *J Cell Sci* **114**: 161-172.

SUN-WADA, G. H., Y. WADA and M. FUTAI, 2003 Lysosome and lysosome-related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-type proton ATPase. *Cell Struct Funct* **28**: 455-463.

WAGNER, C. A., K. E. FINBERG, S. BRETON, V. MARSHANSKY, D. BROWN *et al.*, 2004 Renal vacuolar H+-ATPase. *Physiol Rev* **84**: 1263-1314.

WICKS, S. R., R. T. YEH, W. R. GISH, R. H. WATERSTON and R. H. PLASTERK, 2001 Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat Genet* **28**: 160-164.

WIECZOREK, H., D. BROWN, S. GRINSTEIN, J. EHRENFELD and W. R. HARVEY, 1999 Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *Bioessays* **21**: 637-648.

WILLIAMS, B. D., B. SCHRANK, C. HUYNH, R. SHOWNKEEN and R. H. WATERSTON, 1992 A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics* **131**: 609-624.

YANCEY, P. H., M. E. CLARK, S. C. HAND, R. D. BOWLUS and G. N. SOMERO, 1982

Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.

YOCHUM, J., M. SUNDARAM and M. HAN, 1997 Ras is required for a limited number of cell fates and not for general proliferation in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* **17**: 2716-2722.

ZHU, J., R. J. HILL, P. J. HEID, M. FUKUYAMA, A. SUGIMOTO *et al.*, 1997 *end-1* encodes an apparent GATA factor that specifies the endoderm precursor in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Genes Dev* **11**: 2883-2896.

LEGENDS

Figure 1: Mutagenesis and identification of *rdy* mutations

(A) Strategy for the identification of *rdy* mutations. After TMP/UV mutagenesis, the progeny of individual F1 animals was examined for the presence of rod-looking larvae filled with fluid (top pictures; DIC microscopy), and then for staining with the lipophilic dye DiO (bottom pictures; fluorescence microscopy), which normally labels 12 neurons in the head (large arrows) and their dendrites (arrowheads). Left, wild-type (WT) larvae; right, *rdy-1(mc38)* mutants (the small arrow in the bottom picture points at the pharynx lumen). **(B)** L1 larva alae (arrowheads) of wild-type and *rdy* mutants viewed by DIC microscopy. Larvae are arranged in order of increased severity from WT = *rdy-3* (normal alae) > *rdy-2* > *che-14 = rdy-4* > *rdy-1* (no alae). **(C)** Excretory canal (white arrowheads) of L1 larvae viewed by DIC microscopy and arranged in order of increased severity: the canal was thicker in *rdy-2* mutants; thicker and irregular (black arrowhead) in *rdy-4* mutants; extremely thick in *rdy-1* mutants; essentially absent in *rdy-3* mutants, in which vacuoles (arrow) that progressively grew in size (top 24 hours after egg-laying; bottom 32 hours after egg-laying) could be seen at the level of the excretory cell. Scale bars, 5 μ m.

Figure 2: *rdy-1* corresponds to *vha-5* and codes for a v-ATPase a subunit

(A) Top: Genetic map of chromosome IV showing the positions of markers used to map *rdy-1*. *rdy-1(mc37)* and *rdy-1(mc38)* mutations were positioned between the left breakpoint of *eDf18*, which is defined by cosmid *K07H8*, and a SNP located in cosmid *D2096*. **Middle:** Among cosmids in this region, *F35H10* rescued the lethality of *rdy-1(mc38)* larvae (number of rescued lines indicated on the right). **Bottom:** RNAi

and further rescuing tests proved that *rdy-1* corresponds to the gene *F35H10.4/vha-5*, whose exon-intron structure is shown along with the positions of *mc37* and *mc38*.

(B) More detailed description of the molecular lesions corresponding to *vha-5(mc38)* and *vha-5(mc37)*: top, wild-type sequence flanking the deletion breakpoints (slashes); bottom, mutant sequence and distance to the nearest stop codon.

Figure 3: *rdy-2* encodes two putative tetraspan proteins

(A) Top: Genetic map of chromosome V showing the positions of markers used to map *rdy-2*. *rdy-2(mc39)* and *rdy-2(mc40)* mutations were positioned between a SNP localized in the cosmid *T10G3* and the left breakpoint of *itDf2*, which is defined by the cosmid *T03D2*. Middle: Among cosmids in the area, only cosmids *C50B8* and *F53F4* (bold) could rescue the lethality of *rdy-2(mc39)* larvae (the number of rescuing lines tested for the presence of cosmid DNA by PCR is indicated on the right). Bottom: Among PCR-generated sub-fragments of *F53F4*, only *F53F4.6* could rescue the lethality of *rdy-2(mc39)* larvae. **(B)** Predicted exon-intron structure of *F53F4.6* according to Wormbase version WS157 (top), and actual exon-intron structure of *rdy-2* transcripts deduced from RT-PCR experiments using the primers symbolized between both structures (half arrows; S, sense; R, reverse; nucleotides are numbered relative to the first AUG according to WS157). The positions of conserved areas in the *C. briggsae* *F53F4.6* homologue are symbolized with a dotted line. **(C)** More detailed description of the molecular lesion corresponding *rdy-2(mc40)* (see Fig. 2B for symbols). **(D)** Topology of the long and short RDY-2 proteins as predicted by the software TMHMM version 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/); the N-term extension of the long protein is indicated in grey.

Figure 4: *vha-5* and *rdy-2* mutants have enlarged excretory canals

(A) Transmission electron microscopy (TEM) images of a wild-type (WT), *vha-5(mc38)* and *rdy-2(mc39)* L1 larvae. The outline of the excretory canal is marked with a white dotted line. Note the enlarged section of the canal in *rdy* mutants and its dark appearance in the *rdy-1/vha-5* larva. The average canal section was $0.22 \pm 0.05 \mu\text{m}^2$ in wild-type L1 larvae, $0.69 \pm 0.31 \mu\text{m}^2$ in *vha-5(mc38)* larvae ($p < 0.0005$), and $0.44 \pm 0.11 \mu\text{m}^2$ in *rdy-2(mc39)* larvae ($p < 0.0001$). Scale bar, $0.5 \mu\text{m}$. **(B)** DIC and GFP fluorescence view of the excretory canal (arrowheads) in transgenic larvae expressing a VHA-8::GFP construct; VHA-8 is the V1 sector E-subunit. Note that VHA-8 was very diffuse in *vha-5* larvae. Scale bar, $2 \mu\text{m}$.

Figure 5: VHA-5 and RDY-2 are essential for secretion of matrix material by sheath cells

(A) Schematic drawing showing the approximate positions of the different TEM transverse sections in panels B-F. All images correspond to L1 larvae. **(B)** Wild-type (WT) and **(C)** *vha-5(mc38)* larvae, close to the tip of the nose. The left and right magnifications show the amphid opening at the level of the socket channel (arrow, terminal sensory dendrites) and a stack of membrane sheets (arrowhead), respectively; amphid neurons were normally enclosed by the socket channel in *vha-5(mc38)* mutants, but membrane sheets were disrupted (arrowhead). **(D)** Wild-type, **(E)** *vha-5(mc38)* and **(F)** *rdy-2(mc39)* larvae, further posteriorly, showing ciliated neurons surrounded by the amphid sheath. Note in the enlarged view (right), the dark material (arrowhead in D) in the extracellular space around ciliated dendrites (arrow), which is absent in the two *rdy* sections. Instead, there is empty space around the dendrites (arrowheads), particularly in the *vha-5* larva. Scale bars, $1 \mu\text{m}$.

Figure 6: VHA-5 and RDY-2 are required for secretion of cuticle material

(A, B) TEM through the cuticle of wild-type (WT), *vha-5(mc38)* and *rdy-2(mc39)* L1 larvae. Scale bars, 0.5 μ m. **(A)** In *vha-5(mc38)* larvae, stacked sheets of membrane (arrowhead) originating from the apical plasma membrane are irregular, the cuticle is irregular (arrow) and it has partially detached from the epidermis (black arrowhead). **(B)** The alae of *vha-5(mc38)* larva are absent, and those of the *rdy-2(mc39)* larva have a flat structure, compared to control alae. **(C)** DIC and GFP fluorescence view of the epidermis in L1 transgenic larvae expressing a VHA-8::GFP construct. As in the excretory canal (see Fig. 4), VHA-8 is very diffuse in the *vha-5* larva, and the epidermis is vacuolated. Scale bar, 5 μ m.

Figure 7: CHE-14, VHA-5 and RDY-2 co-accumulate in the epidermis of *vha-5* mutants affecting secretion but not in their sensory organs

(A) Fluorescence micrographs showing VHA-5::GFP (left) and RDY-2::GFP (right) fusion proteins in different adults (top panels), or VHA-5::CFP and RDY-2::YFP fusion proteins in the same L2 larva (bottom panel). Both proteins are expressed in the same tissues, i.e. the amphid sheath cell (top), the excretory cell and canal (middle), the epidermis (bottom, arrowhead). Top panel, lateral view; bottom panels, ventral views. Scale bars, 10 μ m. **(B)** Confocal Z-projections through the epidermis (apical, top of each panel) showing the distributions of CHE-14::YFP and RDY-2::CFP in heterozygous (left) or homozygous (right) *vha-5(mc38)* adults carrying a *vha-5(L786S)::mrfp* mutant transgene (denoted *Ex[L786S]*). All three fluorescent proteins accumulate and colocalize (white arrow) in homozygous *vha-5(mc38)* animals; the *che-14* transgene was generally too weak to be detected in the excretory canal (yellow arrowhead). **(C)** Scheme of the *C. elegans* mouth (for the

sake of simplicity, IL sensory organs are not represented), showing sensory organs where VHA-5 and RDY-2 are expressed. The XZ projection of confocal micrographs (bottom left) shows partial colocalization of VHA-5 and RDY-2 in the apical sheath cells of the amphids (larger dotted circles) and CPE (small dotted circles), and/or in the sheath cells of the OLQ sensory organs (arrowheads); two of the four CPE/OLQ organs seem to have no red signal because it was more difficult to detect on the other side of the animal. **(D)** XY projections of confocal micrographs through the head of heterozygous (left) or homozygous (right) *vha-5(mc38)* adults carrying a *vha-5(L786S)::mrfp* mutant transgene, and YZ section through an amphid organ (corresponding to the dotted arrow in the XY projection). CHE-14 was uniquely expressed in the socket cell (left to the arrowhead; the sheath cell is right to the arrowhead). Five transgenic animals were examined in details by confocal microscopy; scale bars, 5 μm .

Figure 8: VHA-5 and actin microfilament distributions are jointly reorganized during molting

Confocal micrographs showing the distributions of actin, as revealed by the *vha-8::vab-10_{ABD}::yfp* construct noted ABD::YFP (it corresponds to the Actin-Binding domain of VAB-10 fused to YFP), VHA-5::CFP and DLG-1::RFP transgenes at four different time points during larval development. **(A)** XY projections showing actin and VHA-5. Actin microfilaments form parallel bundles during molts (first and third rows), which become disorganized between molts (second and fourth rows). VHA-5 distribution (second column) follows the same pattern, forming aligned dots during molts and dispersed dots in inter-molts. Both markers colocalized during molts (merge pictures). **(B)** Magnification of the apical side of the epidermis during the L4-

adult molt when actin bundles are better organized. VHA-5::CFP dots (arrowheads) colocalize with ABD::YFP on the most apical and parallel actin bundles both in XY and XZ projections, rather than on the faint and less organized subapical actin filaments that we reproducibly observed in XZ projections (arrows). **(C, D)** ABD::YFP bundles surrounding the seam cells (arrowheads) colocalize with DLG-1::RFP at the apical junctions between the hyp7 syncytium (H) and seam cells (S). VHA-5::CFP is shown in violet in panels A-B (to enhance the contrast), in blue in panels C-D.

TABLE 1: Phenotypes of the *rdy* mutants

Genotype	% Rdy (N) ¹	stage of let ²	DiO(+) neurons ³	Alae ⁴
Wild type	0	-	10.5 +/- 1 (n=20)	+++
<i>che-14(mc35)</i>	49 (n=305)	L1 to adult	1.2 +/- 1 (n=20)	+
<i>rdy-1(mc37)</i>	21 (n=241)	mid-L1 (n=18)	1.1 +/- 2.2 (n=24)	-
<i>rdy-1(mc38)</i>	24 (n=228)	mid-L1 (n>50)	1.5 +/- 2.7 (n=13)	-
<i>rdy-2(mc39)</i>	23 (n=245)	L2 (n>50)	1.1 +/- 2.1 (n=10)	++
<i>rdy-2(mc40)</i>	22 (n=262)	L2 (n=21)	1.3 +/- 2 (n=21)	++
<i>rdy-3(mc41)</i> ⁵	21 (n=571)	90% L2/ 10% L3 (n=38)	0 (n=20)	+++
<i>rdy-4(mc42)</i>	22 (n=380)	mid-L1 (n=25)	0 (n=10)	+
<i>rdy-4(mc43)</i>	23 (n=248)	mid-L1 (n>50)	1.2 +/- 1 (n=20)	+

¹ Percentage of rod-looking larvae filled with fluid in the progeny of heterozygous *rdy* mutant strains, or in the progeny of homozygous *che-14(mc35)* animals. Although the proportion of Rdy larvae was always below 25%, we believe that their lethality is fully penetrant, as their transparency makes them difficult to spot and as we never recovered viable adults laying only Rdy larvae.

² Stage when larvae ceased to move, which was assessed at least 48 hours after egg-laying.

³ Number of amphid chemosensory neurons that were stained by DiO, which can normally stain 12 neurons in wild type animals.

⁴ Presence of absence of alae under DIC microscopy with an arbitrary score ranging from +++ to - (see Fig. 1C).

⁵ *rdy-3(mc41)* larvae were frequently found to die off food, which is further indication that they have defective chemosensory organs.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Complementation tests and mapping of *rdy* mutations

The seven *rdy* mutations were assigned to chromosomes by standard genetic mapping (BRENNER 1974), using the strains MT3751 and MT464. Below, for each mutation the number and marker in parentheses correspond to animals homozygous for that marker segregating Rdy larvae: *mc37* (2/28 *unc-5*); *mc38* (1/25 *unc-5*); *mc39* (3/30 *dpy-11*); *mc40* (8/28 *dpy-11*); *mc41* (0/30 *unc-32*); *mc42* (2/30 *rol-6*); *mc43* (0/29 *rol-6*). In crosses between *mc38/ unc-24(e138) dpy-20(e1282)* hermaphrodites and *mc37/ +* males, we observed 43% males/ 46% hermaphrodites/ 10% Rods (N=677), showing that *mc37* and *mc38* are allelic; they define the gene *rdy-1*. In crosses between *mc39 unc-76(e911)/ sqt-3(sc63) him-5(e1467) unc-76(e911)* hermaphrodites and *mc40 unc-76(e911)/ dpy-11(e224) unc-42(e270)* males, all Unc hermaphrodites from the progeny segregated Dpy animals, showing that *mc39* and *mc40* are allelic; they define the gene *rdy-2*. In crosses between *mc42/ rol-6* hermaphrodites and *mc43/ +* males (and *mc43/ rol-6* hermaphrodites and *mc42/ +* males), we observed a partial complementation with 3% Rdy larvae (instead of the expected 12%: N>700 in each case), could not recover *mc42/ mc43* trans-heterozygotes from these crosses segregating 50% Rdy larvae (N=100). Since these mutations map to the same area (see below) and are phenotypically very similar (see text), we suggest that they define the gene *rdy-4* and exhibit a partial hetero-allelic complementation. We conclude that *rdy-4* and *rdy-5* are located on LGII; *rdy-3* on LGIII; *rdy-1* on LGIV; *rdy-2* on LGV.

rdy-1. Among Unc non-Dpy or Dpy non-Unc recombinants segregating from *unc-24 dpy-20/ rdy-1* animals, we found the following distances: *unc-24* –9– *rdy-1(mc37)* –30– *dpy-20* and *unc-24* –19– *rdy-1(mc38)* –60– *dpy-20*. Among Dpy non-Rdy animals segregating from *rdy-1 dpy-20/ unc-129* animals, we found *rdy-1(mc38)* –7– *unc-129* –63– *dpy-20*. Among Dpy non-Rdy animals segregating from *rdy-1 dpy-20/ Hawaiian* animals, 7/8 recombinants had the Hawaiian profile for *D2096* (5'-GGAGCTTACGAAAAATCACAG and 5'-GCTCGAATTGATAACGTGTCG, *EcoRI*) and a Bristol profile for *F08B4*, one recombinant had the Bristol profile for both cosmids. To test if the deficiency *eDf18* in this region deletes *rdy-1*, we crossed heterozygous males with CB3823 hermaphrodites and observed 6% and 8% Rdy larvae in the cross-progeny (N=368 and N=538, respectively), suggesting that *rdy-1(mc37)* and *rdy-1(mc38)* mutations are located under *eDf18* and that they are very strong or null alleles. We determined the left endpoint of *eDf18*, by PCR tests on *eDf18* dead embryos using primers located in the cosmids *F20D12*, *F57H12*, *C26B2*, *F42G8*, *C07G1*, *T09A12*, *K07H8*, *F35H10* and *T26A8*. We could amplify DNA fragments corresponding to all cosmids up to *K07H8* (5'GTGAATGCGTCCACGATGAAG and 5'CTACTTCCCTAACACTTCGCGC), but not to *F35H10* (5'AGTCTCTGTACTGCTTGTTCC) and 5'CCGCTTATCTTACACTATTCAG) and *T26A8*. We conclude that the left boundary of *eDf18* is located between *K07H8* and *F35H10*, and that *rdy-1* is located within the interval defined by *K07H8* and *D2096*.

rdy-2. Among Dpy non-Rdy recombinants segregating from *dpy-11 rdy-2/Bergerac* animals, we found the following distances: *dpy-11* –22– *bP1* –9– *rdy-2(mc39)* and *dpy-11* –19– *bP1* –13– *rdy-2(mc40)*. Among Dpy non-Unc or Unc non-Dpy recombinants segregating from *rdy-2/ sqt-3 him-5 unc-76* animals, we found

sqt-3 –21– *rdy-2(mc39)* –30– *unc-76*. All Unc non-Rdy recombinants segregating from *rdy-2 unc-76*/ Hawaiian animals displayed the Hawaiian restriction profile for *D2023*, *R11D1*, *C26E1*, *T10G3*, and *F35E12*, but 3/7 (for *mc39*) and 2/8 (for *mc40*) displayed a Bristol restriction profile for *AH10* (5'-GCTTGACAAACGAGCTCTACC-3' and 5'-CCAAAACCTGCAGAATTAGG, *Tfil*). Among Dpy non-Rdy recombinants segregating from *sqt-3 rdy-2*/ Hawaiian animals, 8/9 (for *mc39*) and 9/9 (for *mc40*) animals displayed the Hawaiian profile for *T10G3*, and 1/9 (for *mc39*) had the Bristol profile. To test which deficiency in this area deletes *rdy-2*, we crossed MT5813 and KK627 hermaphrodites with *rdy-2(mc39)/+ males*, and found Rdy larvae in the cross with MT5813 but not KK627; these larvae had the same appearance as *rdy-2(mc39)* larvae and their frequency was suggesting that *mc39* is a strong or null allele. Since the left boundary of *itDf2* is defined by the cosmid *T03D2* (ZHU *et al.* 1997), we conclude that *rdy-2* maps between *T10G3* and *T03D2*.

rdy-4. Among Sqt non-Unc recombinants segregating from *dpy-2 rdy-4/ unc-4 sqt-1* animals, we found that none was segregating Rdy larvae (*mc42*, N = 5; *mc43*, N = 6). Reciprocally, from the same heterozygous animals, picking Dpy non-Rdy recombinants, we observed the following distances: *dpy-2* –8– *unc-4* –5– *rdy-4(mc42)*, and *dpy-2* –11– *unc-4* –5– *rdy-4(mc43)*, suggesting that *rdy-4* is located to the right of *unc-4* and close to *sqt-1*.

Characterization of *rdy-2* transcripts

To determine the structure of *rdy-2* transcripts, we performed RT-PCR experiments using primers indicated in **Sup. Fig. 1**. Our findings differ in several respects from the predicted structure of *F53F4.6* proposed in www.wormbase.org (WS157): we identified two potential 5' ends for the *rdy-2* mRNA, both of which were

downstream of that predicted for *F53F4.6*, and one additional exon before the last predicted exon. Indeed, we could not amplify any DN7A using a 5' primer corresponding to the first predicted *F53F4.6* exon, while we could do so using a primer located within the second predicted *F53F4.6* exon. Moreover, using a primer corresponding to the SL1 spliced leader we could amplify a fragment starting in the middle of the second predicted *F53F4.6* exon. We thus suggest that *rdy-2* transcription is probably initiated somewhere upstream of the primer S1577 (see **Fig. 3B**, **Sup. Fig. 1A**) to generate a transcript that is further shortened by trans-splicing. Translation of the long version starting at the first boxed AUG codon in **Sup. Fig. 1A** would produce a protein of 264 residues, while translation of the SL1-transspliced transcript would produce a protein lacking the first 66 residues (referred to below as long and short RDY-2 proteins). In support of the existence of two different *rdy-2* transcripts, the sequence AUGUCAG/AU, which we suggest provides an initiation codon for the long *rdy-2* transcript (underlined) and a trans-splice acceptor sequence (**AG**) leading to the formation of the short *rdy-2* transcript, is conserved in the related species *C. briggsae* and *C. remanei*. Similarly, the two putative RDY-2 proteins are conserved (**Sup. Fig. 1B**). In contrast sequences upstream of this AUG and the first predicted *F53F4.6* exon are poorly conserved. The shorter *rdy-2* transcript is also conserved among ESTs of the more distant parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Strongyloides stercoralis* (www.nematode.net/blast), indicating that it might carry the most important function.

Mosaic analysis of *vha-5*

Using the *vha-5::gfp* construct described above we performed a mosaic analysis to determine in which tissue *vha-5* was essential. Specifically, we examined

dead Rdy larvae segregating from homozygous transgenic *vha-5(mc38); Ex[vha-5::gfp]*. We found that larval lethality is mainly due to loss of *vha-5* expression in the excretory system, since all Rdy larvae had lost *vha-5::gfp* expression in the excretory system (**Sup. Table 1**). However, larvae retaining expression in the epidermis could survive longer than Rdy larvae with no expression at all, implying that the epidermis also requires VHA-5 function to maintain animals healthy (**Sup. Table 1**). To specifically rescue *vha-5* function in the excretory cell we used promoter deletions in *vha-5* promoter, as we could not find any well-characterized gene expressed in the excretory system but not in the epidermis (**Sup. Fig. 2A**). One *vha-5* promoter deletion remained active in all cells expressing *vha-5*, except in the epidermis after the L4/adult switch, and rescued the larval lethality of *vha-5(mc38)*. The corresponding adults displayed thinner alae than wild type adults and their cuticle was not closely apposed everywhere to the epidermis when examined by electron microscopy (**Sup. Fig. 2BC**), as also observed in *vha-5* null mutants (**Fig. 6AB**). We conclude that the cuticle defects do not result from the absence of VHA-5 function in the excretory system.

Supplementary Figure 1: structure of the two *rdy-2* transcripts

(A) Sequence of the 5' part of *rdy-2*, which corresponds to the 2nd predicted exon in WS157 (splice acceptor site boxed). RT-PCR experiments could amplify a product using primer S1577 (half arrow), or a primer corresponding to the SL1 spliced leader sequence linked to the sequence starting at the vertical arrow (AUCAAGCG), immediately downstream of the splice acceptor site AUGUCAG. The former mRNA (starting at position S1577 or upstream) could use the first boxed AUG

(grey) to initiate translation; the latter should lead to a shorter protein starting at the next in frame AUG (black). Positions of *rdy-2* alleles are marked with an arrowhead or a double-headed arrow. **(B)** Sequences of the putative long (top line) and short (starting on 2nd line) RDY-2 proteins are aligned with their homologues from the related species *C. briggsae* (WS157) and *C. remanei* (genomeold.wustl.edu/projects/cremanei). Black lines I to IV show predicted transmembrane segments. *rdy-2(mc39)* and *rdy-2(mc40)* positions are indicated by white arrowheads.

Supplementary Figure 2: VHA-5 is required to generate normal adult alae

(A) Dissection of the *vha-5* promoter. Each line depicts the promoter sequence (thick line) present upstream of the VHA-5 and GFP coding regions. Expression (+), absence (-) or weak expression (parentheses) of the GFP in tissues where it is normally expressed was assayed: Sup, support cells; Exc, excretory cell; larval Hyp, larval epidermis; adult Hyp, adult epidermis; Ut, uterus; Rec, rectum. **(B, C)** GFP fluorescence (left), SEM (middle) and TEM (right) micrographs of a *vha-5(mc38)* animal rescued by the control *vha-5::gfp* transgene (pML670, noted *vha-5; Ex[+]*), or by the promoter deletion construct that abrogates GFP expression in the adult epidermis (noted *vha-5; Ex[ΔHyp]*). Note in (B) the punctate GFP expression in the epidermis (left), the regular annulae (arrowhead in SEM picture) and the normal alae (arrow in SEM and TEM); conversely note in (C) the absence of GFP expression in the epidermis (left), the disrupted annulae (arrowhead in SEM), the flat alae (arrow in TEM) and large vacuoles causing an apparent detachment between the epidermis and the cuticule (black arrows). Scale bars, 5 μm.

Supplementary Table 1: Mosaic analysis suggests that *vha-5* is required for viability in the excretory system and to a lesser extent in the epidermis

Tissue	Presence of GFP ¹			
Excretory cell	+	-	-	-
Excretory duct cell	+	+	-	-
Epidermis	+	+	+	-
Number of larvae	>600 ²	5	14	172
Stage 26 hours post egg-laying	mid-L2 young L2	Late	L1/ young L2	L1/ young L2

¹ Larvae segregating from *vha-5(mc38); Ex[vha-5::gfp]* transgenic animals were examined for the presence of GFP in the excretory cell, excretory duct cell and the epidermis: +, GFP present; -, GFP absent.

² All larvae expressing the GFP in the excretory system reached adulthood, except two that had very short excretory canal and filled with fluid in late larval development.

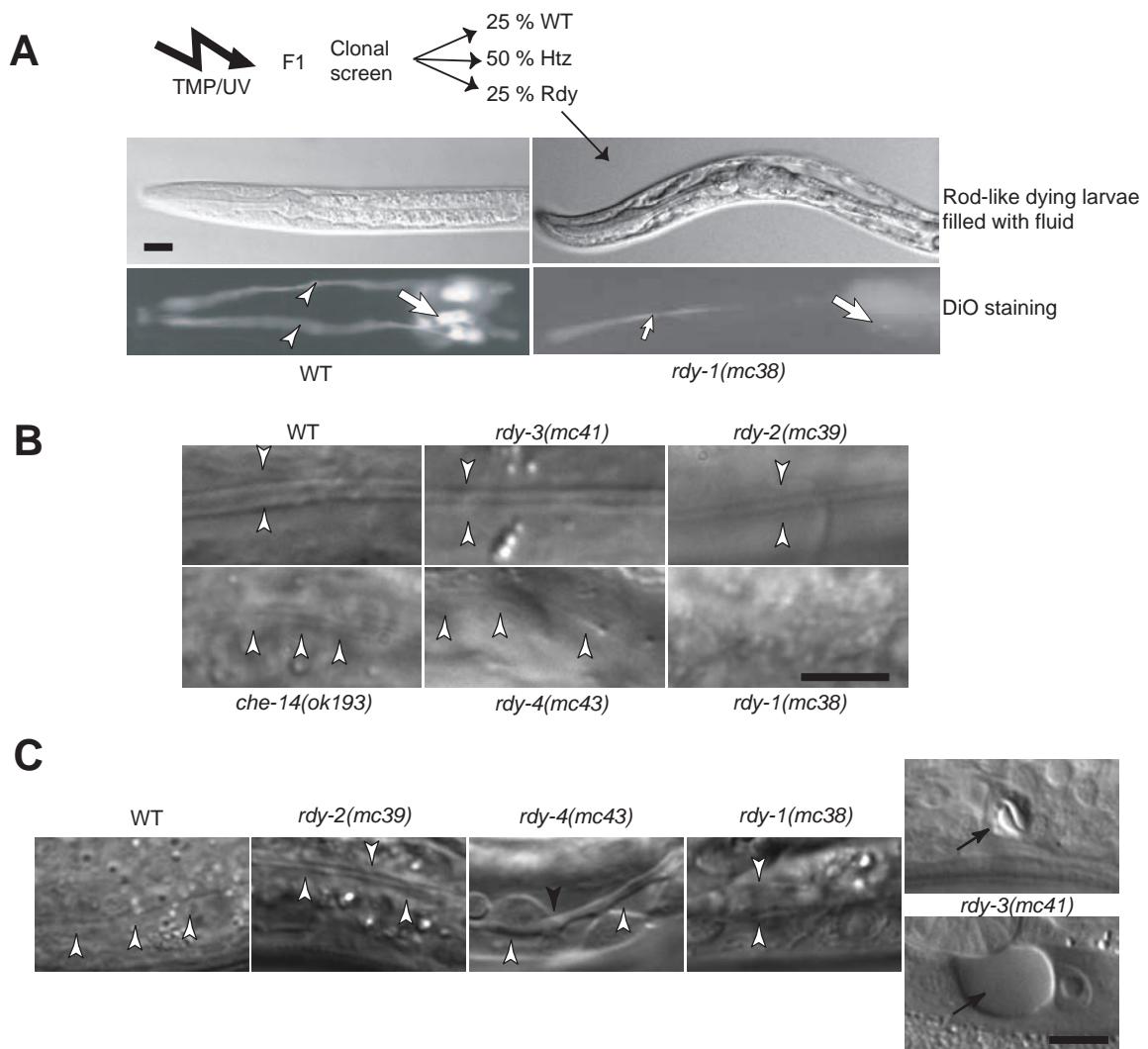


Figure 1

Liégeois et al

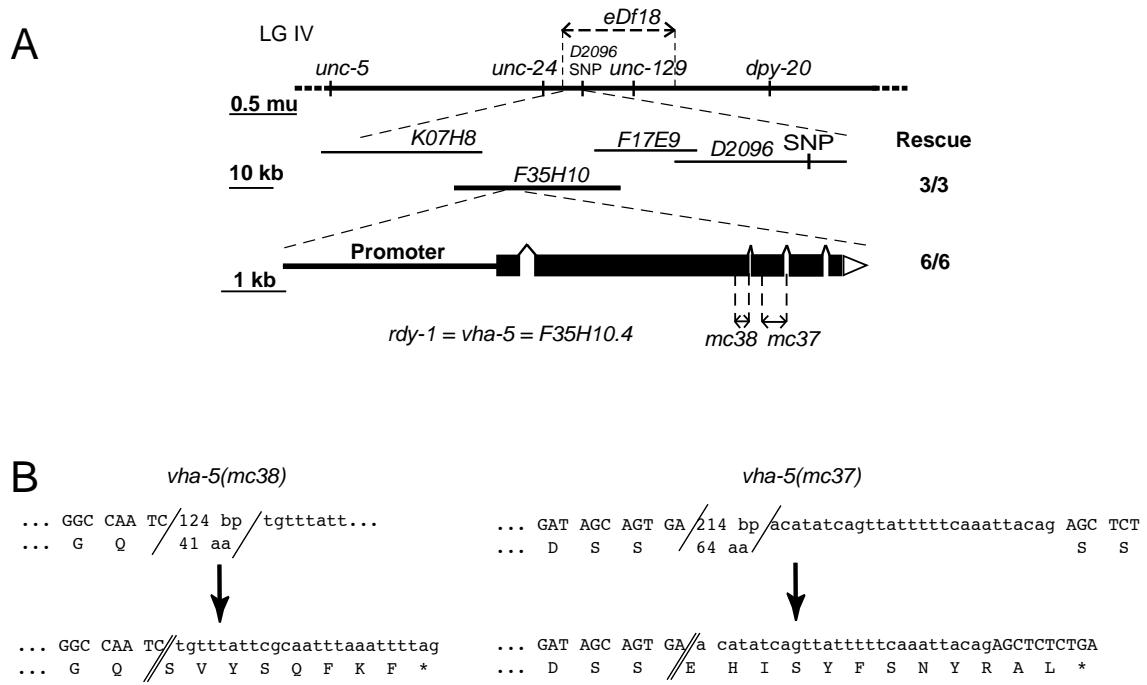


Figure 2

Liégeois et al

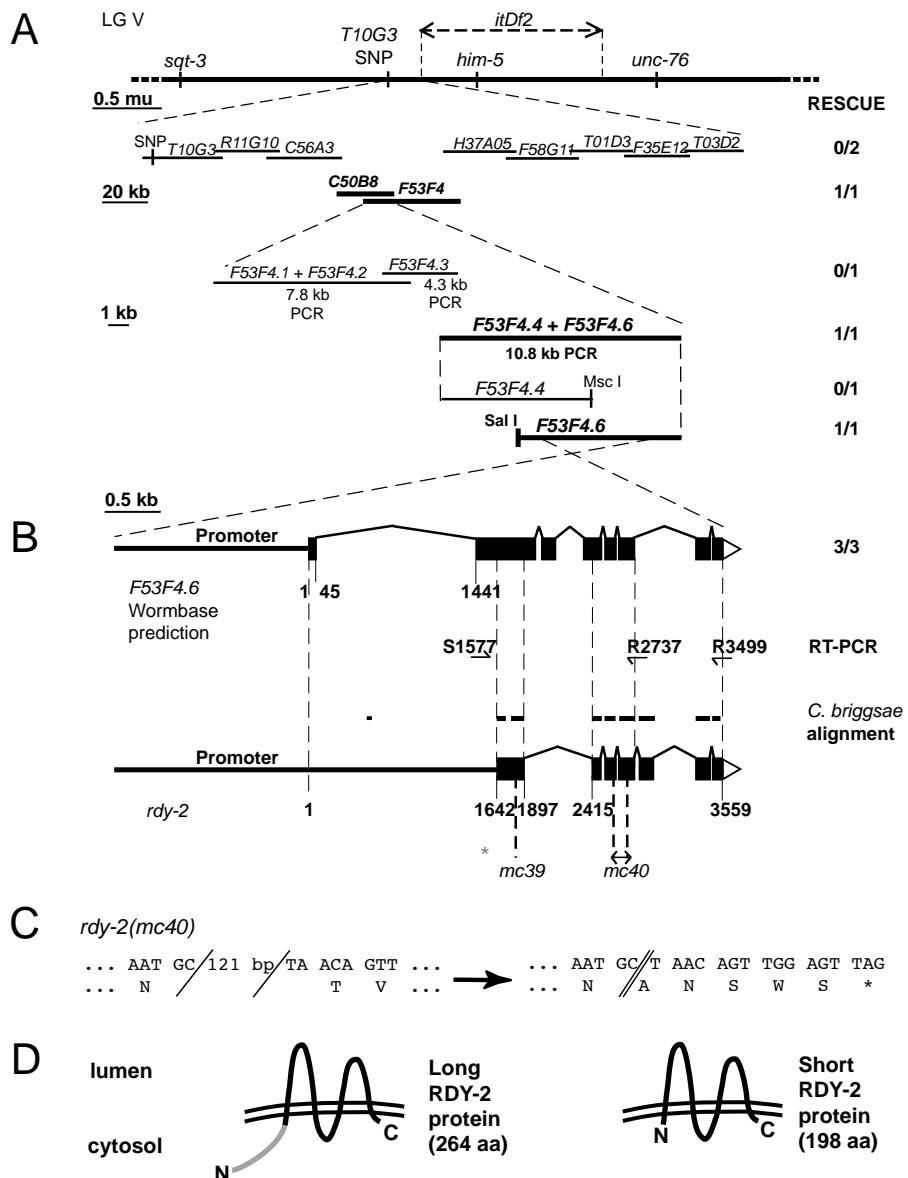


Figure 3

Liégeois et al

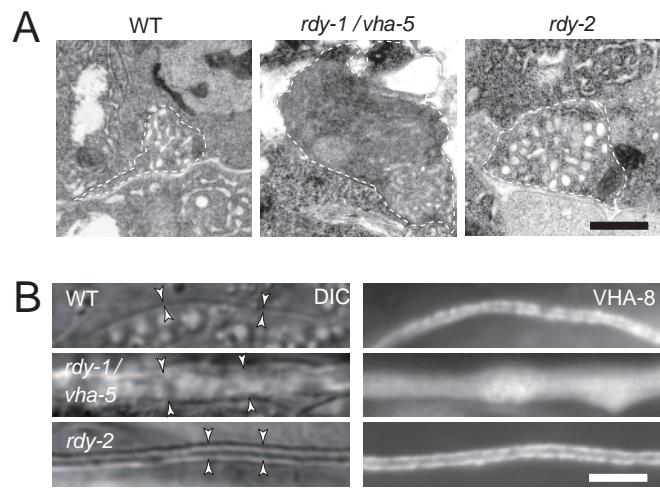


Figure 4

Liégeois et al

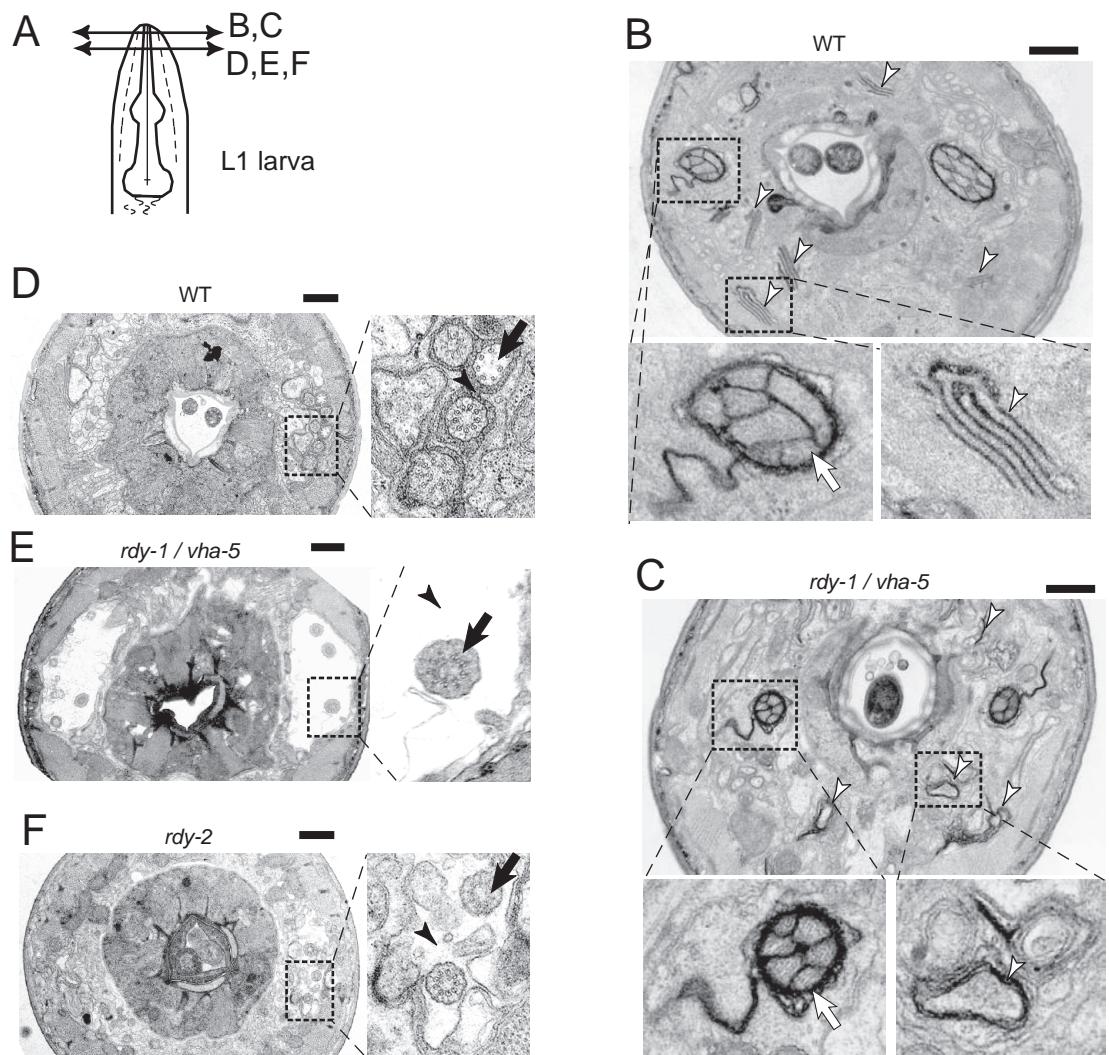


Figure 5

Liégeois et al

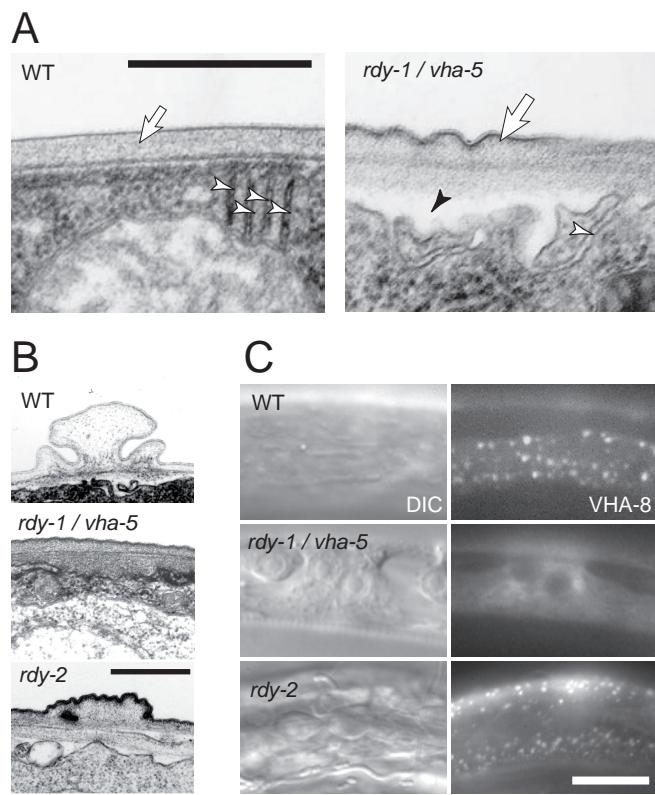


Figure 6

Liégeois et al

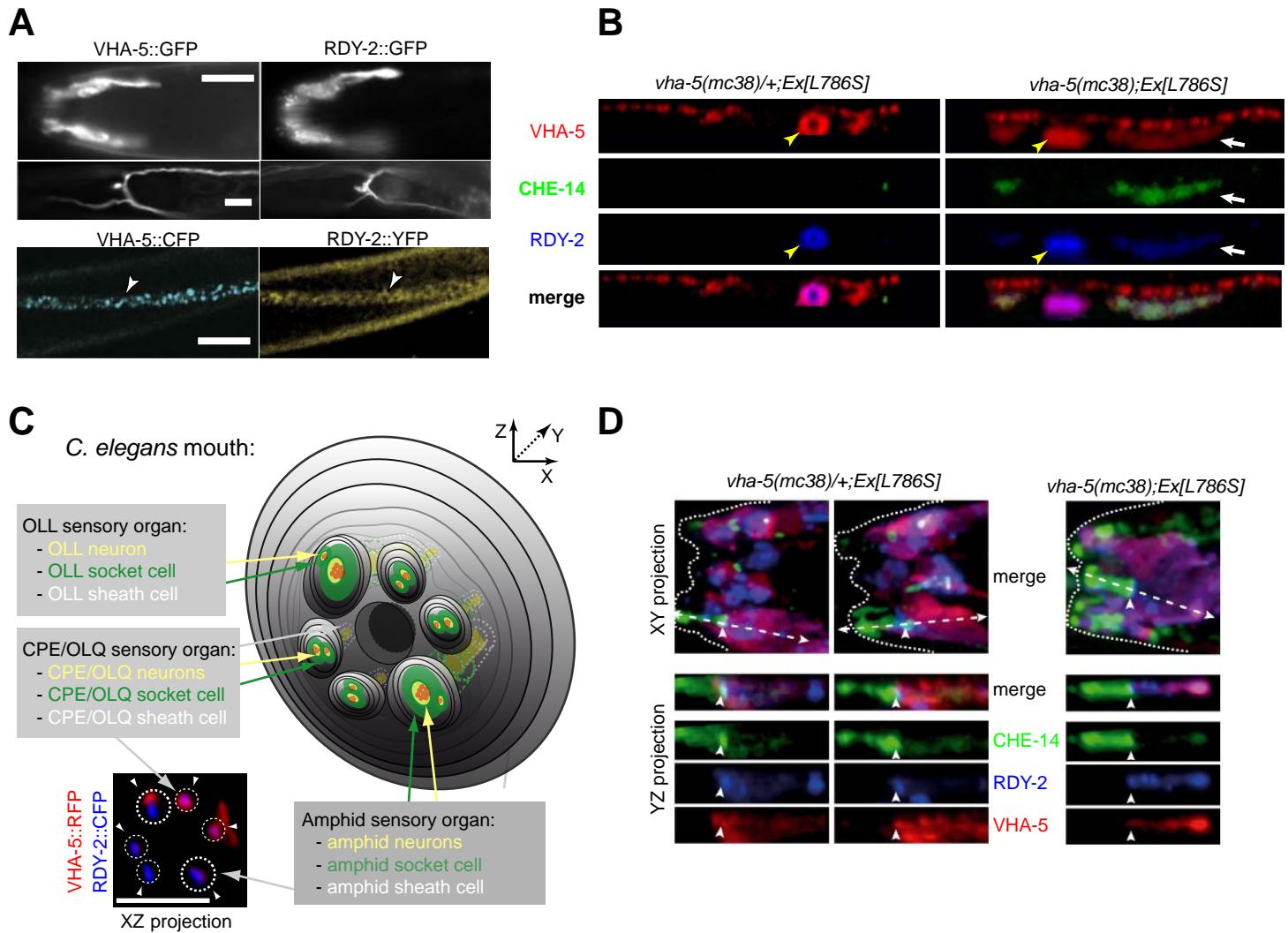


Figure 7

Liégeois et al

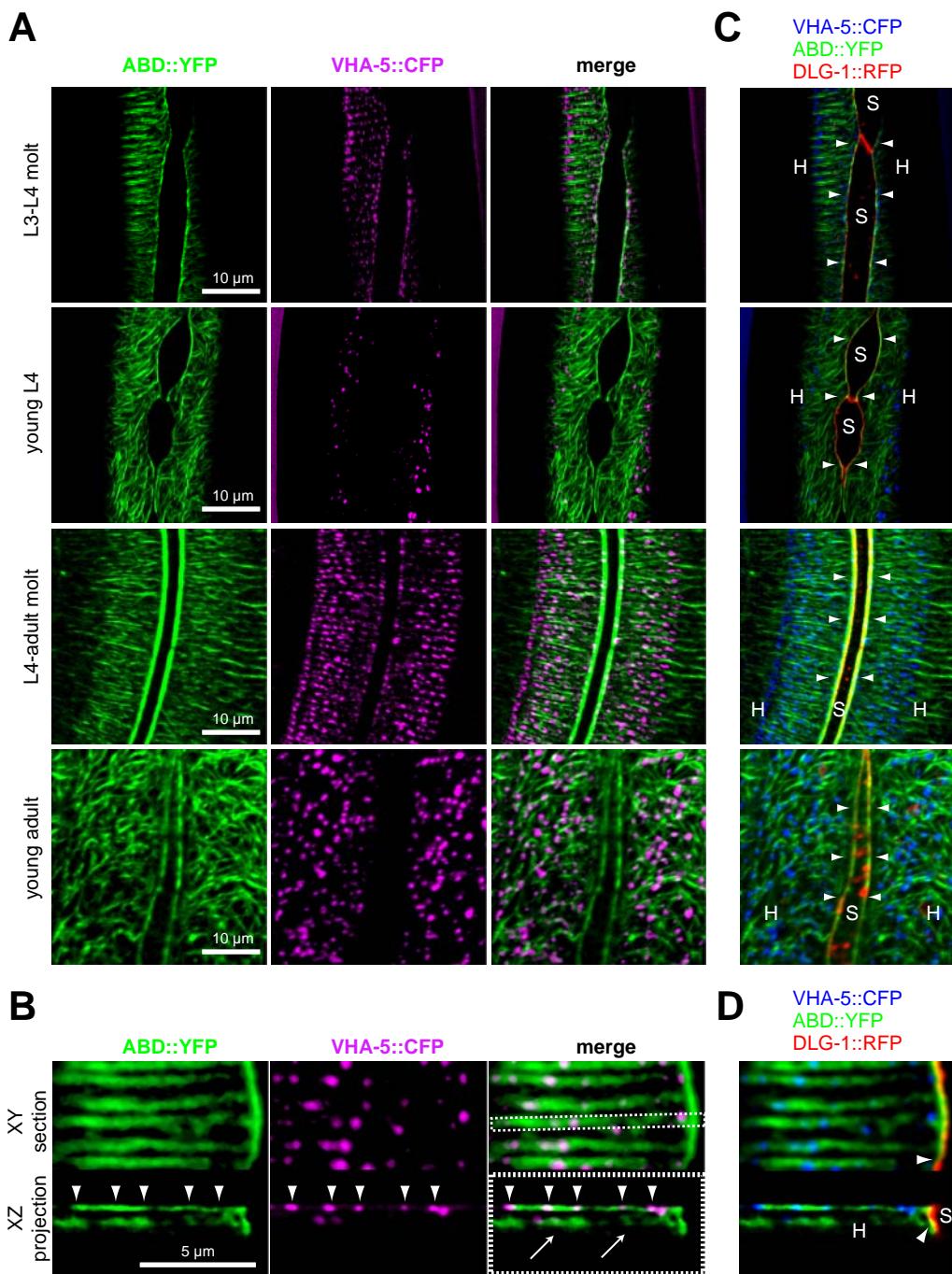


Figure 8

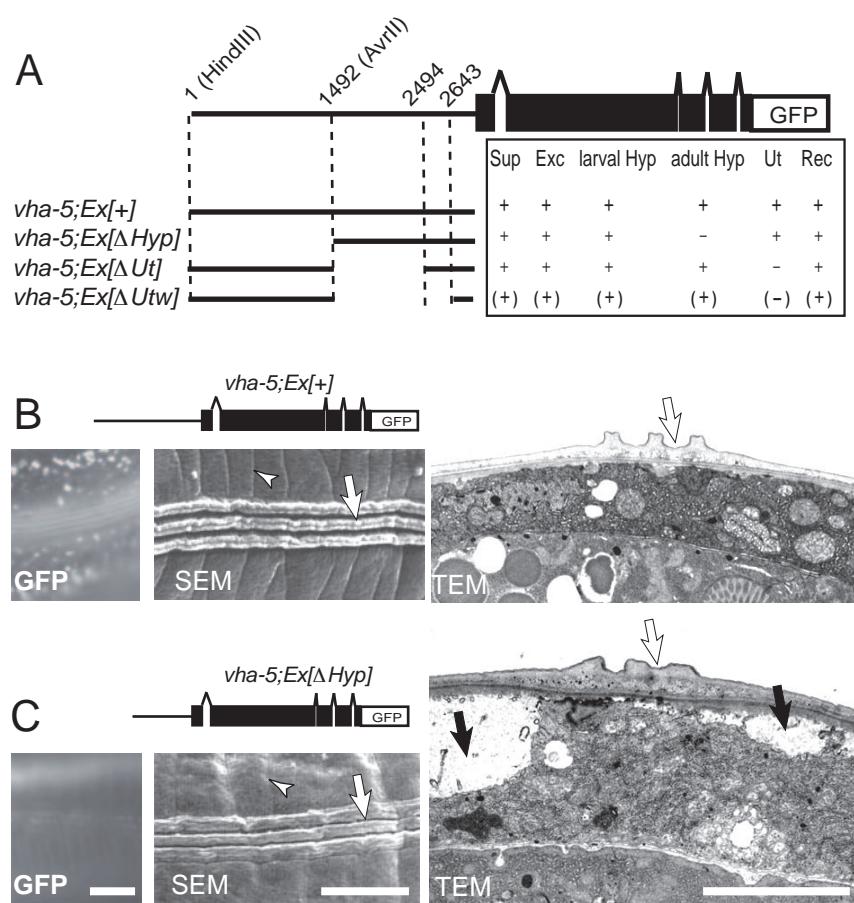
Liégeois et al

A
 STOP **SPlice**
 [UAA] AAG AGU AAC CAA CAA AUU CCA UUU UCA UCC AUC AUU UUC UAU UUA UGU ACU GUU [CAG] UUU
 CCC CUU GAC AUC CAA CCU GUU CUC CUU CUA UUU CUA UAU UUG UCA CCU GCU CAU UGC CAA UUG
 CGU AAC CGA CUG ACU UUC ACU CCC AAU CGA GCC AUC CGU GUC AUC CGG UUU UUA AUC GCU UUC
 CUU CUU CUA CUU CUU CCA AAU CUC GAC GGU UAU AUC CUC UGG UGU UUC CAC AAU AAC ACA GAC
 AGU CAU ACA [AUG] UCA GAU CAA GCG AAU CGA GUC GUG UAC GUU GAA CAA AGG CGG CAC AUU GUC
 GUC AAU UCA CCA CCA CGC UCA ACA CCA UUA CAU CAU UUU CCU GUA AAU CAG UAU UCU UCU
 GCU UCU UCA UCW CAU CCA CCU ACG AAU AAU CAA UCU CAA CAA CAG AUU UAU CAA AGA AAU
 ACG ACA AGA AGG AGA AAA [AUG] UUC UCG ...

B	RDY-2	
<i>C. elegans</i>	: MSDOANR VVY VEORRHIVVNNSPPOSPTLHHFPVN OYSSA---SSSHHPTTINOSOOOIOYRNTTRRK	: 66
<i>C. briggsae</i>	: MSDOANR VVY VEORRHIVVNNSPPOSPTLHHFPVN ROYSGVAETTSNNPPLSLHPPL EYRVRNDE--RN	: 67
<i>C. remanei</i>	: MSDOANR VVY HEORRHIVVNNSPPOSPTLHHFPVN OYSASSSNPPPPLSQPQOLYRTTTLSNTPNTRKK	: 69
	mc39	mc40
<i>C. elegans</i>	: MFSORAFNGIVFCIRIFIL ILAI VSMILVLTAPGACFSRYLNGOSISRE ICPGONSIFPMNADRWSNAL	: 135
<i>C. briggsae</i>	: MFSORAFNGIVFCIRIFIL ILAI VSMILVLTAPGACFSRYLNGOSISRE ICPGONSIFPMNADRWSNAL	: 136
<i>C. remanei</i>	: MFSORAFNGIVFCIRIFIL ILAI VSMILVLTAPGACFSRYLNGOSISRE ICPGONSIFPMNADRWSNAL	: 138
	I mc40	
<i>C. elegans</i>	: HFOGRGON VYGOVALICITLAFLGLITVGVSCVTLATNSILITYP OILISGLSMVAFIVGGVETWYATGY	: 204
<i>C. briggsae</i>	: HFOGRGON VYGOVALICITLAFLGLITVGVSCVTLATNSILITYP OILISGLSMVAFIVGGVETWYATGY	: 205
<i>C. remanei</i>	: HFOGRGON VYGOVALICITLAFLGLITVGVSCVTLATNSILITYP OILISGLSMVAFIVSGGVETWYATGY	: 207
	II	III
<i>C. elegans</i>	: DHMEFFIO AVGNGVFGSCAGIPGCQIOFVVKGWA AAFYFLGALLYVVDMSLIFISREK	: 264
<i>C. briggsae</i>	: DHMEFFIO AVGNGVFGSCAGIPGCQIOFVVKGWA AAFYFLGALLYVVDMSLIFISREK	: 265
<i>C. remanei</i>	: DHMEFFIO AVGNGVFGSCAGIPGCQIOFVVKGWA AAFYFLGAVLYVIDMALIFISREK	: 267
	IV	

Supplementary Figure 1

Liégeois et al



Supplementary Figure 2

Liégeois et al

2 Rôle du secteur V0 de la V-ATPase dans la sécrétion épidermique apicale.

2.1 Présentation de l'article 2.

Cet article est celui dans lequel je me suis le plus investi. J'ai décidé d'en reprendre les quelques points essentiels pour en faciliter la lecture et ajouter quelques observations non publiées.

2.1.1 Contexte initial de l'étude.

A l'issue du crible de phénotype du mutant *che-14* décrit précédemment, nous avons approfondi l'étude de *rdy-1*, correspondant à *vha-5*, gène codant pour une sous-unité « a » du secteur V0 de la V-ATPase de *C. elegans*.

VHA-5 étant une sous-unité du complexe protéique V-ATPase, on s'est demandé si les défauts des mutants nuls *rdy-1* reflétaient une perte de fonction(s) spécifique(s) de *vha-5*, du sous-complexe V0, ou de la V-ATPase. Nous avions l'espoir de voir affectées dans notre modèle (les mutants *rdy-1*) à la fois la fonction osmorégulatrice de la V-ATPase et cette fonction de fusion membranaire spécifique de V0 citée précédemment. C'est en partant de cette idée que le travail sur *vha-5* réalisé par Samuel Liégeois et moi et supervisé par Michel Labouesse a été initié.

2.1.2 Les mutations de *vha-5* affectent deux fonctions biochimiques distinctes : la fonction de pompe à protons de la V-ATPase, et une fonction spécifique du secteur V0 indépendante de V1.

2.1.2.1 Mise en évidence d'une fonction spécifique de V0.

Si deux fonctions existent : l'une spécifique de V0 et l'autre due à un défaut de la pompe V0+V1, l'inactivation sélective par ARNi de sous-unités de V0 ou de V1 devait

pouvoir le montrer. C'est donc ce que j'ai fait en inactivant tour à tour deux sous-unités de V0 (VHA-1 et VHA-4) et deux autres de V1 (VHA-8 et VHA-13).

Tous ces ARNi les provoquaient un défaut d'endocytose des vitellines par les œufs visualisé avec le rapporteur fluorescent YP170 ::GFP (Grant and Hirsh 1999), et qui est à l'origine de la létalité embryonnaire (Oka and Futai 2000; Choi, Ji et al. 2003). Ensuite, les quelques larves échappant à la létalité embryonnaire meurent toutes au stade L1, dès qu'elles requièrent une V-ATPase zygotique active pour réguler leur pression osmotique, et à l'instar des animaux ayant subi une ablation laser de la cellule excrétrice (Nelson and Riddle 1984). Enfin les adultes ayant grandi depuis L2 sur des bactéries ARNi présentent des canaux excréteurs élargis formant des pelotes (comme les mutants *exc-2*, *-3*, *-5* et *-8*, Figure 39), et accumulent dans leur pseudocœlome les vitellines non « endocytées » par leur œufs. L'ensemble de ces défauts désigne clairement une dysfonction de la V-ATPase qui requiert l'ensemble V0 + V1 pour fonctionner.

En revanche, à sévérité de phénotypes d'osmorégulation comparable, seuls les ARNi dirigés contre V0 induisaient de sévères défauts d'alae au stade L1 (observés avant la mort de ces larves). Cette observation indiquait qu'il existe une fonction spécifique de V0, ne requérant pas V1 et impliquée dans la morphogenèse de la cuticule du ver au stade L1. L'ARNi dirigé contre *vha-5* n'étant pas complètement pénétrant, j'ai obtenu des animaux qui survivaient jusqu'au stade adulte et montraient des défauts nets de la cuticule adulte (*alae* et *annuli* parfois totalement absentes). Ce résultat signifiait que le processus spécifique de V0 est probablement requis tout au long de la vie post-embryonnaire du ver chaque fois qu'une nouvelle cuticule est formée. Corolairement, cela indiquait qu'il était possible de l'étudier sur l'adulte (au lieu de travailler sur la L1 qui est 10 fois plus courte et 1000 fois plus petite en rapport volumique). Mieux, le fait de pouvoir observer un phénotype au stade adulte ouvrait la possibilité de travailler sur des animaux capables de se reproduire et de se maintenir facilement.

2.1.2.2 Obtention et étude de mutants hypomorphes viables affectés soit d'une perte de la fonction spécifique de V0 soit d'un défaut de pompe V-ATPase.

La sous-unité « a » étant essentielle à V0 et à l'association V0-V1, son inactivation se répercute à la fois sur les fonctions associées au secteur V0 seul et à la V-ATPase. Michel a donc décidé de lancer avec Samuel Liégeois et Jean-Marie Garnier une mutagenèse dirigée de *vha-5*, dans le but d'obtenir des mutants hypomorphes permettant de discriminer les deux fonctions de V0. Samuel a criblé 56 mutations ponctuelles, en observant la cuticule (forme des alae) et le canal excréteur (élargissement, pelotes ?). 6 d'entre-elles étaient aussi sévères que les délétions *mc37* et *mc38*, tandis que les 48 autres étaient viables. Parmi

celles-ci, seules 6 induisaient des phénotypes : soit des défauts du canal sans défauts d'alaé (mutants « canal », substitutions W190A et R191A), soit des défauts d'alaé sans défaut de canal (mutants « cuticule », L786S, E830Q et V844F), ou bien les deux types de défauts (mutant « mixte », W327A). Les différents défauts observés en microscopie optique classique ont été confirmés par Samuel en microscopie électronique, et par moi-même en microscopie confocale à épifluorescence.

Les phénotypes trouvés dans les classes de mutants « cuticule » rappellent les défauts spécifiques des ARNi dirigés contre les sous-unités de V0 : vers plus courts et défauts d'alaé L1 et adulte Si ces défauts sont associés à la perte d'une fonction, il s'agirait donc d'une perte de celle spécifique de V0, et impliquée dans la sécrétion épidermique.

Inversement, les phénotypes des mutants « canal » : élargissement et formation de pelotes au niveau du canal excréteur, rappelaient clairement les défauts observés en cas d'ARNi tardif contre les sous-unités de V0 aussi bien que de V1. Ceci indiquait que ces mutants étaient probablement affectés pour la fonction de la pompe V0+V1 et non pour la fonction spécifique de V0.

Ceci signifiait que nous avions réussi pour la première fois dans un organisme métazoaire, grâce à ces mutations, à découpler deux activités de V0 : l'une (spécifique de V0) impliquée dans la sécrétion, l'autre (en association avec V1) impliquée dans l'osmorégulation.

2.1.3 Investigation de la fonction de V0 dans la sécrétion.

2.1.3.1 Des protéines de type Hedgehog s'accumulent chez les mutants « cuticule ».

La cuticule de *C. elegans* étant majoritairement composée de collagènes, un défaut de sécrétion ou d'organisation des collagènes pouvait être responsable des défauts de cuticule chez les mutants « cuticule ». Des immunomarquages contre le collagène *dpy-7* ont révélé que DY-7 était correctement secrétés dans tous les contextes mutants. Comme dans d'autres systèmes la maturation et la sécrétion des collagènes sont des processus stéréotypés, nous avons pensé qu'il y avait peu de chances que les autres collagènes du ver se comportent différemment dans les contextes mutants pour *vha-5*. De plus, comme il existe plus de 175 collagènes différents chez *C. elegans*, il aurait été peu raisonnable de les cloner un par un pour les observer dans les différents contextes mutants.

Plusieurs observations m'ont conduit à étudier des protéines de type Hedgehog chez *C. elegans*.

En premier lieu, *che-14*, la première mutation identifiée dans le laboratoire comme affectant la sécrétion apicale épidermique (Michaux, Gansmuller et al. 2000; Michaux, Legouis et al. 2001), invalide l'orthologue chez *C. elegans* de Dispatched (gène de *Drosophila melanogaster*) et de Disp1 (chez *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*) qui sont impliqués dans la sécrétion de Hedgehog (*D. mel.*) ou Sonic-Hedgehog (*M. mus.*) et leur action à longue distance (Burke, Nellen et al. 1999; Greco, Hannus et al. 2001; Ma, Erkner et al. 2002). Ce qui fait des protéines de type Hedgehog des candidats privilégiés dans la recherche de cibles de la voie de sécrétion impliquant CHE-14. Ensuite, en 1999, Aspöck et coll. (Aspock, Kagoshima et al. 1999) publiaient l'expression de plusieurs gènes de la famille Hedgehog, baptisés « warthog » (*wrt-1* à *wrt-6*, et *wrt-8*), « groundhog » (*grd-1*, *grd-3*, *grd-5*, *grd-6*, *grd-7*) et « ground-like » (au total il existe plus de 50 gènes de type Hedgehog chez *C. elegans*). La plupart des gènes *wrt-* se révélaient exprimés dans les cellules épithéliales, dont l'épiderme majeur. De plus, les protéines que ces gènes codent semblaient avoir conservé un domaine « Hint » actif (Porter, Ekker et al. 1996; Aspock, Kagoshima et al. 1999) qui permet leur autoclavage en une partie N-terminale destinée à la sécrétion et une partie C-terminale cytosolique (pour revue (Ingham and McMahon 2001; Cohen 2003)). Nous avons donc pensé que certaines de ces protéines Warthog et Groundhog pouvaient être sécrétées par l'épiderme du ver. Enfin, les mutants *che-14* et *vha-5* se ressemblent de par leur létalité mais aussi les défauts qu'ils présentent au niveau de la cuticule et qui marquent particulièrement les *alae*, structures dont on sait qu'elles ne contiennent pas que des collagènes mais aussi des cuticulines (Sapiro, Hilliard et al. 2005), et au moins une protéine de type Hedgehog (Hao, Mukherjee et al. 2006).

J'ai alors pu observer que les mutants « cuticule » et « mixte » accumulaient spécifiquement les protéines transgéniques WRT-2 ::GFP ou WRT-8 ::GFP avec VHA-5 ::RFP dans des compartiments cytoplasmiques de l'épiderme syncytial hyp7. En revanche, ce n'était pas le cas des mutants « canal » ni des vers contrôle. Ce n'était pas le cas non plus en contexte hétérozygote transgénique pour une construction mutante « cuticule », indiquant que les accumulations ne résultait pas d'un mauvais routage de VHA-5 ::RFP du à un problème de repliement de la protéine ou d'instabilité du complexe V0.

Ces observations confortaient les hypothèses formulées précédemment, et suggéraient que la fonction spécifique de V0 était importante pour la sécrétion correcte des protéines de type Hedgehog chez *C. elegans*. Cependant les compartiments accumulés que j'avais pu observer devaient être visibles en microscopie électronique à transmission.

2.1.3.2 Les compartiments d'accumulation des protéines de type Hedgehog sont des corps multivésiculaires (CMVs).

Samuel, utilisant la microscopie électronique à transmission, a pu retrouver des structures denses aux électrons anormalement accumulées dans l'épiderme hyp7 des mutants « cuticule » et absentes ou peu abondantes dans les vers contrôle et les mutants « canal ». Il s'est avéré que ces compartiments étaient des corps multivésiculaires denses (CMVDs) anormaux et des corps hybrides entre CMVDs et lysosomes (révélé par la présence de vésicules internes et de structures multilamellaires), correspondant vraisemblablement à des figures de dégradation de type endosome tardif (Raiborg, Rusten et al. 2003).

Les résultats de la MET corroboraient ceux que j'avais obtenus en microscopie confocale, cependant il nous fallait établir clairement la correspondance entre ces deux types d'observations. Nous avons donc cherché dans un premier temps un marqueur moléculaire des structures décrites comme des CMVs (MVB pour « multivesicular bodies » en anglais). Parmi les protéines impliquées dans la biogénèse des CMVs (cf. introduction), HRS/VPS27 est particulièrement bien caractérisée (Bache, Brech et al. 2003; Katzmann, Stefan et al. 2003) et une fusion traductionnelle GFP de VPS-27, son homologue chez *C. elegans*, était disponible au laboratoire de Renaud Legouis (Roudier, Lefebvre et al. 2005). J'ai donc co-injecté le transgène dans les contextes mutants W190A, L786S, E830Q et dans le contrôle. J'ai ensuite observé chez les mutants « cuticule », que VPS-27 marquait les compartiments pressentis pour correspondre aux CMVDs observés en MET et où VHA-5::RFP s'accumulait, alors qu'en accord avec nos prédictions, ce n'était pas le cas chez les mutants « canal ». La colocalisation nette de VPS-27 et VHA-5 au niveau des accumulations observées en confocal suggérait fortement que ces accumulations étaient des CMVs. Cependant, nous n'avions toujours pas de preuve directe de l'identité entre les CMVDs de MET et ces probables CMVs accumulant VPS-27.

Lorsque notre article a été revu, on nous a suggéré de réaliser des immunolocalisations de WRT-2 et VHA-5 sur coupes ultrafines en MET. Cette technique étant difficile à mettre au point, particulièrement après fixation chimique, nous avons opté pour la cryofixation à haute pression (Hobot and Newman 1996) (déjà utilisée avec succès pour la MET chez *C. elegans* (Rostaing, Weimer et al. 2004) mais aussi pour la tomographie électronique (Lucic, Forster et al. 2005; Hsieh, Leith et al. 2006)), qui permet d'obtenir une bonne ultrastructure en préservant l'immunoréactivité, et d'éviter un certain nombre d'artéfacts (comme ceux générés par l'extraction des lipides en fixation chimique, et certaines déformations). Nous avons profité de l'acquisition récente par le laboratoire de Patrick Schultz à l'ESBS, de l'EMPACT2 de Leica (Studer, Gruber et al. 2001). J'ai travaillé

avec Yannick Schwab pour mettre au point la cryofixation, et l'immunolocalisation de VHA-5 et WRT-2. en utilisant un anti-VHA-5 généré au laboratoire et un anti-GFP commercial pour localiser WRT-2 ::GFP, j'ai observé que VHA-5 ::RFP et WRT-2 ::GFP s'accumulaient au niveau des CMVDs chez les mutants « cuticule » E830Q.

2.1.3.3 L'accumulation de CMVDs résulterait d'un défaut de sécrétion d'exosomes médiée par le secteur V0.

L'accumulation de compartiments multivésiculaires peut avoir deux origines : soit un défaut de la voie endolysosomale en aval des endosomes précoces (défaut de dégradation lysosomale par exemple), soit un défaut de sécrétion d'organites (comme les lysosomes sécrétoires) qui sont alors redirigés vers la voie dégradation dont le rendement basal ne suffit pas à éviter l'engorgement. La V-ATPase étant impliquée dans la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes (van Deurs, Holm et al. 1996; Sultana, Rivero et al. 2005), et le secteur V0 seul contenant Vph1p étant impliqué dans la fusion homotypique des vacuoles de levure (Bayer, Reese et al. 2003), on ne pouvait pas exclure que la fonction spécifique de V0 affecte l'endocytose via un défaut de fusion/fission de compartiments de la voie endolysosomale comme c'est le cas de la mucolipine CUP-5 par exemple (Fares and Greenwald 2001; Treusch, Knuth et al. 2004). Avant d'éarter ces possibilités, j'ai donc vérifié que différents mutants (ou ARNi) de la voie endocytotique comme *cup-5*, *vps-27*, *rab-7* et *rme-8*, ne présentaient jamais de défauts d'alae, quand bien même ils présentaient des défauts d'accumulation de CMVs et de lysosomes. L'observation qu'aucun mutant « cuticule » ne montre de défaut d'organites lysosomiaux (indiquant par là que la dégradation a correctement lieu chez ces animaux) mais au contraire une accumulation spécifique des CMVDs et d'organites hybrides CMV-lysosomes, confirma que les phénotypes des mutants « cuticule » sont bien différents de ceux des mutants de la voie endocytotique.

Puisqu'il ne s'agissait vraisemblablement pas d'un défaut d'endocytose, nous sommes revenus à notre hypothèse favorite et avons étudié davantage les aspects sécrétoires qui sont très peu connus dans l'épiderme du ver, en lien avec les CMVs.

Samuel a donc réalisé de nombreuses observations en MET sur des vers contrôle pour tenter de comprendre comment des CMVs pouvaient être impliqués dans la sécrétion apicale épidermique. Il a ainsi mis en évidence deux types de CMVs existant naturellement chez le type sauvage et que nous avons baptisés CMVs clairs (CMVCs) et CMV denses (CMVDs) en lien avec leur densité aux électrons qui est corrélée positivement au nombre de vésicules intralumenales des CMVs.

Il est apparu que : les CMVCs sont presque systématiquement situés à proximité de la membrane apicale voire en apposition directe avec elle, tandis que les CMVDs sont un peu moins nombreux et plus éloignés de la membrane apicale. De plus, à diverses reprises nous avons observé des CMVCs fusionnés avec la membrane apicale et larguant dans la cuticule basale leurs vésicules intraluminales, en MET après fixation chimique (fixation durant plusieurs heures) mais également après cryofixation à haute pression (fixation instantanée). Nous avons alors échafaudé un modèle de sécrétion d'exosomes (vésicules sécrétées, (Johnstone and Ahn 1990; Raposo, Nijman et al. 1996; Thery, Zitvogel et al. 2002; Fevrier and Raposo 2004)) médiée par des corps multivésiculaires. Nous avons interprété l'accumulation de CMVDs de grosse taille chez les mutants « cuticule » comme le résultat d'un échec de la fusion de CMVCs avec la membrane apicale, qui, continuant d'être alimentés en membrane et de former des vésicules intraluminales, auraient grossi en devenant plus denses pour donner ces CMVDs anormaux.

2.2 Article 2 : « *The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans ».**

The V₀-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*

Samuel Liégeois, Alexandre Benedetto, Jean-Marie Garnier, Yannick Schwab, and Michel Labouesse

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Louis Pasteur, 67400 Illkirch, France

Polarized intracellular trafficking in epithelia is critical in development, immunity, and physiology to deliver morphogens, defensins, or ion pumps to the appropriate membrane domain. The mechanisms that control apical trafficking remain poorly defined. Using *Caenorhabditis elegans*, we characterize a novel apical secretion pathway involving multivesicularbodies and the release of exosomes at the apical plasma membrane. By means of two different genetic approaches, we show that the membrane-bound V₀ sector of the vacuolar

H⁺-ATPase (V-ATPase) acts in this pathway, independent of its contribution to the V-ATPase proton pump activity. Specifically, we identified mutations in the V₀ "a" subunit VHA-5 that affect either the V₀-specific function or the V₀+V₁ function of the V-ATPase. These mutations allowed us to establish that the V₀ sector mediates secretion of Hedgehog-related proteins. Our data raise the possibility that the V₀ sector mediates exosome and morphogen release in mammals.

Introduction

All developmental and physiological functions performed by epithelia depend on the polarized targeting of the plasma membrane and secreted proteins to either the apical or basolateral plasma membranes (Rodriguez-Boulan et al., 2005). Cargo proteins sorted in the Golgi apparatus and the endosomal system through sets of basolateral- and apical-specific sorting determinants are transported to the plasma membrane following partially different routes (Hoekstra et al., 2004; Rodriguez-Boulan et al., 2005). Although basolateral secretion has been fairly well characterized, the mechanisms involved in apical trafficking remain poorly defined (Rodriguez-Boulan et al., 2005).

Basolateral sorting signals usually correspond to tyrosine or dileucine residues found in the COOH terminus of proteins. They are recognized by basolateral-specific adaptor complexes (Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003; Rodriguez-Boulan

et al., 2005), such as AP-1B in epithelial cells (Folsch et al., 1999). Before membrane fusion and SNARE action, vesicles are thought to be tethered to the basolateral membrane by the exocyst complex (Whyte and Munro, 2002), which was initially identified in yeast (TerBush and Novick, 1995). In metazoans, the exocyst is required for basolateral delivery of the LDL receptor in MDCK cells (Grindstaff et al., 1998; Yeaman et al., 2001), of E-cadherin in the *Drosophila melanogaster* notum (Langevin et al., 2005), and for Rhodopsin1 transport in *D. melanogaster* photoreceptor cells (Beronja et al., 2005). Recent results suggest that AP-1B and the exocyst act primarily in recycling endosomes (Ang et al., 2004; Beronja et al., 2005; Langevin et al., 2005; Lock and Stow, 2005; Satoh et al., 2005), which underlines the central role of this organelle in sorting processes. Indeed, recycling endosomes may be compartmentalized into apical- and basolateral-related domains, or even divided into distinct organelles, suggesting that they could also play a critical role in apical trafficking (Hoekstra et al., 2004; Rodriguez-Boulan et al., 2005).

Aside from this possible role of recycling endosomes, all other aspects of sorting along the basolateral and apical routes seem to differ. Apical signals are more diverse and often correspond to posttranslational adducts, such as lipids or glycans (Schuck and Simons, 2004; Rodriguez-Boulan et al., 2005). For instance, the Hedgehog morphogen is secreted apically upon

S. Liégeois and A. Benedetto contributed equally to this paper.

Correspondence to Michel Labouesse: lmichel@igbmc.u-strasbg.fr

S. Liégeois's present address is Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, F-67000 Strasbourg, France.

Abbreviations used in this paper: DIC, differential interference contrast; mRFP, monomeric red fluorescent protein; MVB, multivesicular body; SEM, scanning electron microscopy; TEM, transmission electron microscopy; V-ATPase, vacuolar H⁺-ATPase.

The online version of this article contains supplemental material.

cholesterol addition, but basolaterally otherwise (Gallet et al., 2003). No specific apical cytosolic complex, akin to AP-1B or the exocyst, has been identified so far. Instead, protein clustering, possibly through lipid rafts, is thought to mediate the sorting and transport of apical cargoes (Schuck and Simons, 2004; Rodriguez-Boulan et al., 2005). In particular, glycosyl phosphatidylinositol-linked proteins appear to form oligomers that are directly targeted to the apical membrane (Paladino et al., 2004, 2006; Hua et al., 2006). Several proteins have been proposed to play an active role in apical protein clustering, raft formation, and/or apical delivery, such as caveolins (Kurzchalia et al., 1992), annexin 13b (Fiedler et al., 1995), and the tetraspan protein VIP17/MAL (Cheong et al., 1999; Puertollano et al., 1999). However, their mechanistic roles have not been fully elucidated, or their implication has been questioned (Manninen et al., 2005). In addition to the limited understanding of apical secretion at the molecular level, it is not clear whether the terminal fusion process involves small vesicles, such as those defined at synapses, or larger organelles, such as secretory lysosomes (Blott and Griffiths, 2002).

Hence, despite the many critical findings originating from tissue culture cells (Rodriguez-Boulan et al., 2005), investigations with other systems and other cargo proteins could help to elucidate the mechanisms involved in apical exocytosis. *Caenorhabditis elegans*, which has contributed to decipher the mechanisms controlling vesicular trafficking (Nurrish, 2002), provides such an in vivo model. We have chosen to analyze apical secretion of cuticle proteins by the epidermis. The cuticle includes glycosylated collagens, glycosyl phosphatidylinositol-linked cuticlin, and lipid-modified Hedgehog-related peptides (McMahon et al., 2003; Sapiro et al., 2005; Zugasti et al., 2005). We previously suggested that the gene *che-14* is required for cuticle secretion (Michaux et al., 2000). The CHE-14 protein is the *C. elegans* orthologue of *Drosophila* Dispatched, which participates in apical targeting of cholesterol-modified Hedgehog (Burke et al., 1999; Gallet et al., 2003).

While searching for *che-14* alleles (Michaux et al., 2000), we uncovered several additional mutations inducing *che-14*-like phenotypes and reasoned that they might identify new components of the apical trafficking pathway. Two such mutations, *mc37* and *mc38*, proved to be small deletions behaving as genetic-null alleles of the gene *vha-5* (unpublished data). The gene *vha-5* encodes one of the four *C. elegans* "a" subunits of the V0 sector of the vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase), and is required for development beyond the L2 larval stage (Oka et al., 2001; Pujol et al., 2001). The V-ATPase is a multisubunit protein complex consisting of two subcomplexes called the V0 and V1 sectors (Fig. 1 A). The cytosolic V1 sector hydrolyses ATP and provides the energy to pump protons through the transmembrane proteolipid pore formed by the V0 sector (Nishi and Forgac, 2002). The V-ATPase is the main proton pump establishing a pH gradient in the secretory and endocytic pathways. It generates a proton-motive force that is essential to load synaptic vesicles with neurotransmitters before secretion (Amara and Kuhar, 1993). The V-ATPase is also found at the apical plasma membrane of polarized cells, where it is essential for osmoregulation in animal excretory systems (Nishi and Forgac, 2002).

More recently, biochemical and genetic data suggested that the V0 sector can play a role independently from the V1 sector. In *Saccharomyces cerevisiae*, vacuoles deficient for the "a" subunit Vph1p do not fuse efficiently (Peters et al., 2001; Bayer et al., 2003). In *D. melanogaster*, neurons lacking the "a" subunit Vha100 accumulate vesicles in synaptic terminals (Hiesinger et al., 2005). In both cases, the defects were independent of the proton gradient and placed downstream of SNARE function (Peters et al., 2001; Bayer et al., 2003; Hiesinger et al., 2005).

By further dissecting the role of *vha-5* using targeted mutagenesis, and by comparing phenotypes resulting from the inactivation of V1 or V0 subunits, we uncover a specific role for the V0 sector in mediating secretion to the apical membrane. In particular, we show that the V0 sector is required for apical secretion of Hedgehog-related peptides through a multivesicular compartment able to release exosomes.

Results

The VO "a" subunit VHA-5 is apical and required for cuticle formation

To determine the distribution and subcellular localization of VHA-5, we raised polyclonal antibodies against its cytoplasmic NH₂ terminus. In addition, we generated a COOH-terminal VHA-5::GFP fusion, which rescued the larval lethality caused by the *vha-5(mc38)* deletion (Fig. 1 B). The VHA-5 antiserum recognized a 105-kD protein in wild-type extracts (Fig. 1 C, lane a). To prove its specificity, we examined extracts from *vha-5(mc38)* homozygous animals carrying the rescuing VHA-5::GFP construct. The VHA-5 antiserum failed to detect the ~105-kD band in these extracts, but detected an ~135-kD band (Fig. 1 C, lane b). These results are consistent with *vha-5(mc38)* being a small deletion associated with a frameshift (Fig. 1 B and not depicted) and with the presence of 257 additional residues in the GFP-fusion protein. We conclude that the VHA-5 antiserum is specific and that *vha-5(mc38)* is a molecular null mutation.

In agreement with previously published observations (Oka et al., 2001; Pujol et al., 2001), we found that VHA-5 is expressed in the H-shaped excretory cell corresponding to the *C. elegans* kidney-like organ (Fig. 1, D and E). It is also expressed in the main epidermal syncytium (Fig. 1, D–F), which had previously been overlooked. The excretory cell extends long processes called excretory canals where osmoregulation takes place (Nelson and Riddle, 1984), whereas the epidermis controls body length and apical cuticle secretion (White, 1988). VHA-5 colocalized apically with the V1 subunit VHA-8 in both tissues (Fig. 1 E; note that VHA-5 is not expressed in the lateral epidermis). VHA-5 was localized at the level of apical membrane stacks by immunogold staining (Fig. 1 G). Consistent with VHA-5 distribution and a role of the V-ATPase in osmoregulation (Nishi and Forgac, 2002), *vha-5(mc38)* larvae filled with fluid and died at the L1 stage (unpublished data), which corresponds to the phenotype observed after laser ablation of the excretory cell (Nelson and Riddle, 1984). In addition, *vha-5(mc38)* L1 larvae had a severe malformation of the lateral cuticular specializations known as alae (Fig. 1 D and Fig. 2 A), which are primarily synthesized by the lateral seam cells.

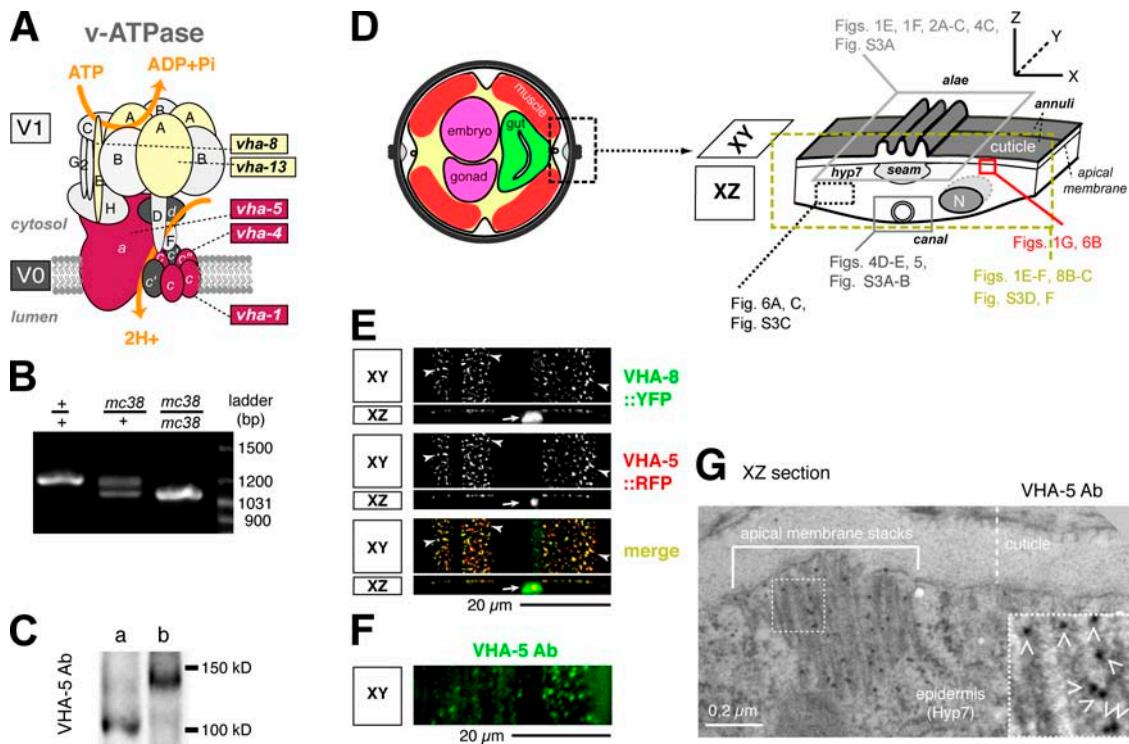


Figure 1. VHA-5 is at the apical membrane in the excretory canal and the epidermis. (A) Drawing of the V-ATPase complex and *C. elegans* subunits analyzed in this study. (B) PCR analysis of wild-type, *vha-5*(*mc38*)/+, and *vha-5*(*mc38*) animals with primers in *vha-5* showing that *mc38* is a small deletion. (C) Western blot with a VHA-5 antiserum of wild-type *C. elegans* extracts [lane a] and *vha-5*(*mc38*) mutants rescued by a *vha-5::gfp* transgene [lane b]. A 105-kD band is visible in wild-type animals, a 135-kD band in rescued *vha-5*(*mc38*) mutants. (D) Drawing of a section through the body (left) and the epidermis (right) showing the positions of the images displayed in this and other figures. (E) Distribution of *vha-5::rfp* and *vha-8::yfp* in rescued *vha-5*(*mc38*) animals; XY confocal section, apical epidermal surface where the pattern appears as dots (arrowheads; excretory canal, arrows). The V1 E subunit VHA-8 (see A) colocalizes with VHA-5. (F) Immunofluorescence image of a wild-type adult with VHA-5 antiserum; VHA-5 forms dots in the epidermis. (G) Immunogold labeling against VHA-5 (gold beads, arrowheads); VHA-5 localizes mainly to apical membrane stacks of the epidermis (see also Fig. S5 D). Fig. S5 is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200511072/DC1>.

Although VHA-5 is not expressed in these cells, the main epidermal syncytium also contributes to their morphogenesis (Sapiro et al., 2005). Because VHA-5 is transmembraneous and not cuticular, the simplest interpretation for this phenotype is that *vha-5* mutations compromise the secretion of proteins needed for alae formation.

The VO sector alone is required for cuticle formation

As outlined in the previous section, the V0 sector may fulfill two distinct functions; either working together with the V1 sector to mediate proton pumping or working alone, as in yeast and *D. melanogaster* neurons, to mediate membrane fusion. To determine which of these functions could account for the cuticle secretion defect observed in *vha-5*(*mc38*) larvae, we examined the role of other V-ATPase subunits in cuticle formation using the RNAi approach. If improper proton pumping is responsible for the aforementioned *vha-5* cuticle defects, RNAi knockdown of either V0 or V1 subunits should result in similar cuticular defects. Conversely if the loss of a V0-specific function accounts for the *vha-5* cuticular phenotype, only RNAi knockdown of V0 subunits should phenocopy *vha-5* cuticle defects. We chose two V1 subunits (VHA-8 and -13) and one V0 subunit (VHA-4) encoded by single-copy genes, which were, thus, expected to be

ubiquitously expressed and to display RNAi phenotypes of comparable severity. In addition, we tested RNAi against the three genes encoding the V0 “c” subunit (*vha-1*, -2, and -3), which are >78% identical at the nucleotide level. We found that the RNAi phenotype of *vha-1* was the strongest and was directly comparable to that of *vha-4*, -8, and -13 (Fig. 2 B'), presumably because it reflects knockdown of all three paralogs.

RNAi against these V1 or V0 subunit genes led to 100% lethality in the progeny of treated animals (Fig. 2 B', bottom bars). It is likely that most embryos died because of a defect in yolk endocytosis, which is known to be sensitive to proton pumping (Choi et al., 2003). In agreement, we found that yolk vitellogenin-GFP accumulated in the pseudocoelom of RNAi-treated animals rather than in oocytes and embryos (Fig. S1, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200511072/DC1>). Despite the strong lethality induced by loss of V-ATPase function, a few L1 larvae hatched and, invariably, died filled with fluid before the L2 larval stage (Fig. 2 B''), as observed for *vha-5*(*mc38*) larvae. Strikingly, we observed before their death that L1 hatchlings displayed severe alae defects when RNAi targeted the V0 subunits *vha-1* or -4, but had wild-type alae after knockdown of the V1 subunits *vha-8* or -13 (Fig. 2, B and B''). Consistent with the phenotype of *vha-5*-null mutants, RNAi against *vha-5* also affected alae formation (Fig. 2, B and B'–C),

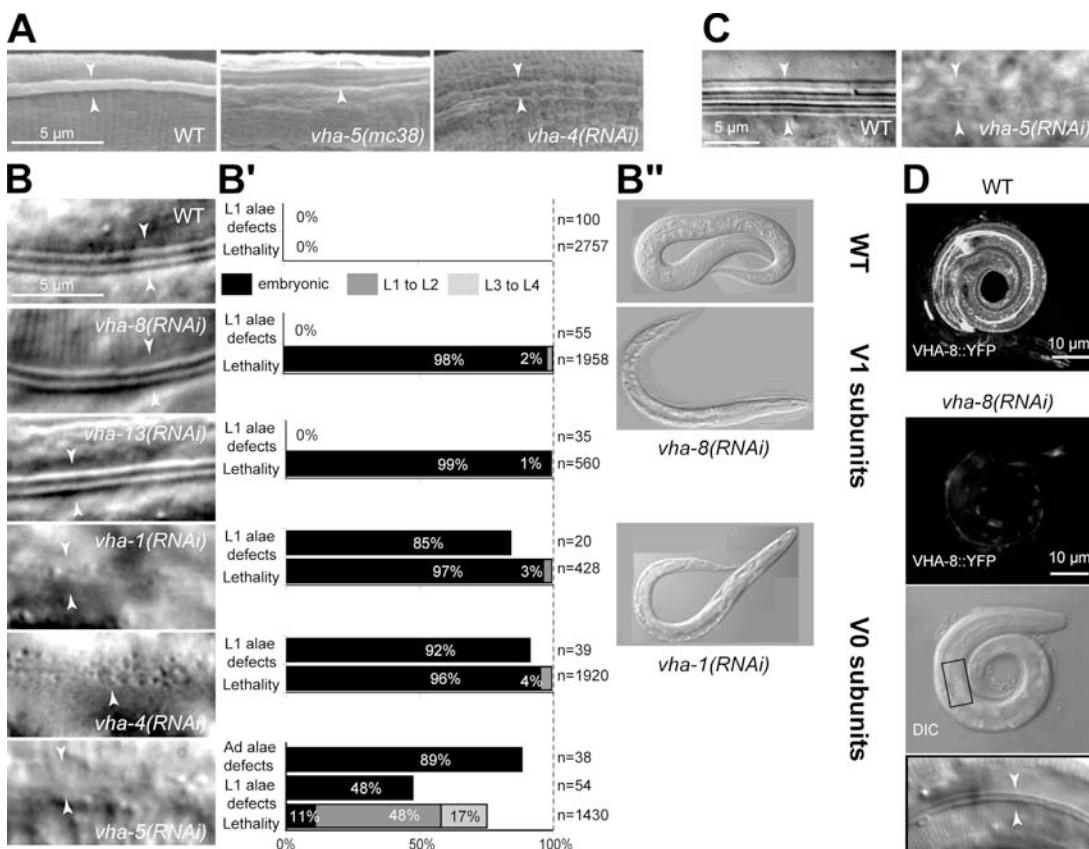


Figure 2. The VO sector is specifically required for cuticle secretion. (A) Alae (arrowheads) of wild-type (WT), *vha-5(mc38)*, and *vha-4(RNAi)* L1 larvae visualized by SEM; *vha-5(mc38)* and *vha-4(RNAi)* larvae have essentially no alae. (B–B') Alae (arrowheads; B), quantification of lethality and alae defects (B') and a representative larva filled with fluid (B'') after RNAi knockdown of the V1 subunits VHA-8 and -13, or VO subunits VHA-1, -4, and -5; images (in B and B'') correspond to DIC micrographs. Lethality, and L1 or adult (Ad) alae defects, were quantified in separate experiments. (C) Alae (arrowheads) of a wild-type adult and an animal that survived until adulthood after RNAi against *vha-5*. Alae are absent in the VHA-5-defective adult. (D) GFP fluorescence of a control L1 larva carrying a *vha-8::gfp* transgene (WT), and after RNAi against *vha-8* (*vha-8(RNAi)*). The RNAi treatment almost completely removed the fluorescence in this larva, yet it has normal alae (see magnified view of the boxed area in the bottom DIC image).

although lethality was weaker because VHA-5 is not ubiquitously expressed like VHA-4. One trivial explanation for the persistence of normal alae after V1 subunit knockdown could be that RNAi was less efficient than for V0 subunits. It is unlikely, as the lethality rates and the larval osmoregulation defects observed after V1 and V0 subunit knockdown were comparable (Fig. 2, B' and B''), hinting that both RNAi were equally effective. To support this idea, we submitted a *vha-8::gfp* transgenic strain to *vha-8* RNAi and verified that it induced a drastic decrease of VHA-8::GFP fluorescence (Fig. 2 D). We conclude that the VO sector is required independently from the V1 sector for apical secretion of some cuticle components.

The two functions of VO are genetically separable

If the VO sector has two distinct functions, it should be possible to recover *vha-5* alleles that affect either its V0-specific secretion function or its V0+V1 proton-pump function. The *vha-5* distribution and the aforementioned phenotypes indicate that reducing V0-specific function should affect cuticle secretion, whereas impairing proton pumping should affect the excretory canal responsible for osmoregulation. To identify such mutations, we used a plasmid rescue strategy, whereby we generated

mutations by using PCR on a rescuing *vha-5::gfp* construct, introducing them into *vha-5(mc38)/+* animals, and recovering live homozygous *vha-5(mc38)* animals whenever possible (Fig. 3 A). We modified charged or large hydrophobic residues, as well as residues previously mutated in the yeast Vph1p (Leng et al., 1996, 1998). We generated 56 mutations (Fig. 3, B and C; and Fig. S2, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200511072/DC1>); 42 had no obvious phenotype by differential interference contrast (DIC) microscopy (Fig. 3 B, stars), and eight failed to rescue, indicating that those residues are essential for VHA-5 function (Fig. 3 B, white boxes). More interestingly, six substitutions rescued the *vha-5(mc38)*-induced lethality and affected the cuticle, or both.

These six mutations defined three classes, which we will call “cuticle mutations” (L786S, E830Q, and V844F), “canal mutations” (W190A and R191A), or “mixed mutations” (W327A). First, animals carrying cuticle or mixed mutations were significantly shorter and dumper than wild-type animals or animals carrying canal mutations (Fig. 4 A). This phenotype is frequently observed for mutations affecting cuticle components (McMahon et al., 2003). Western blot analysis using the VHA-5 antiserum detected similar amounts of mutant VHA-5::GFP proteins (Fig. 4 B), implying that expression level

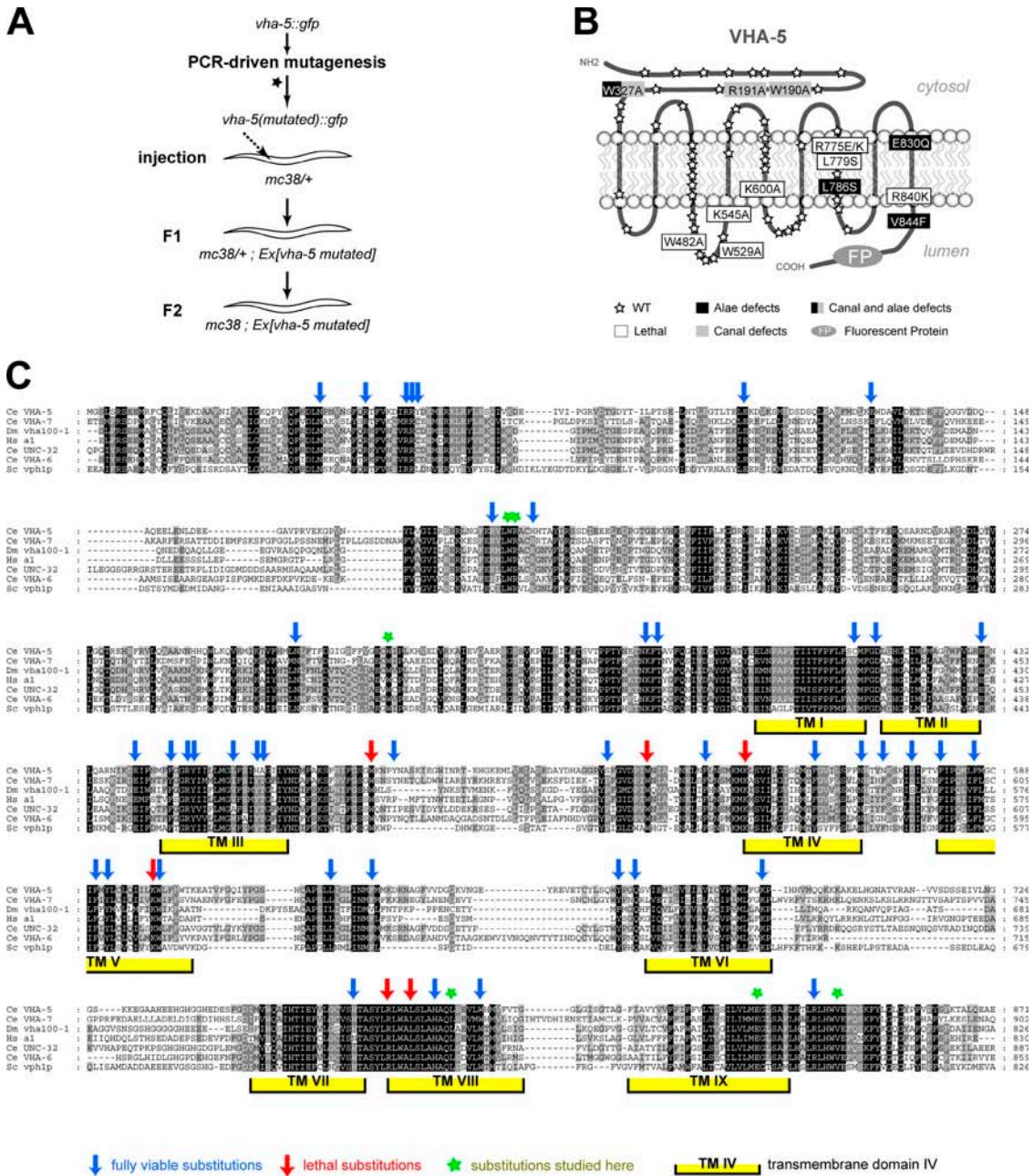


Figure 3. Mutations introduced in the V0 subunit VHA-5. (A) Strategy to generate *vha-5* mutations based on complementation of the *vha-5*-null allele *vha-5(mc38)*. (B) Predicted topology for VHA-5 based on yeast Vph1p (Nishi and Forgac, 2002) and positions of substitutions. Box, symbols for the most important phenotypes (see also Fig. S2). DbClustal alignment (http://bips.u-strasbg.fr/PipeAlign/jump_to.cgi?DbClustal+noid) of VHA-5 with the three other *C. elegans* "a" subunits, VHA-6 (intestinal), VHA-7 (epidermal), and UNC-32 (ubiquitous in the embryo, and then muscular and neuronal), the most closely related human and fly "a" subunits (human ATP6V0a1 and *D. melanogaster* V100), and the *S. cerevisiae* "a" subunit Vph1p. The positions of the mutations and the predicted positions of the transmembrane domains (numbered with roman letters) are indicated above VHA-5. Fig. S2 is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200511072/DC1>.

differences do not explain phenotypic differences. Second, scanning electron microscopy (SEM) showed that adult alae were strongly affected in the former, but not the latter, animals (Fig. 4 C and Fig. S3 A, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200511072/DC1>). Third, confocal microscopy using the mutant VHA-5::GFP as a marker and transmission electron microscopy (TEM) revealed that the excretory canal of animals with canal or mixed mutations, but not with cuticle mutations, was abnormal (Fig. 4, D and E; and Fig. S3, A and B).

Their excretory canals had an increased section, often with multiple lumens, and 3–10 abnormal whorls per canal (see *mc38*; *Ex[W190A]* in Fig. 4 [D and E]). Strikingly, we observed similar phenotypes by knocking down V1 or V0 subunits by RNAi from L3 larval stage until adulthood (Fig. 5). Thus, we infer that the defects induced by canal mutations reflect an impairment of V0+V1 proton pumping, and that they are caused by loss-of-function rather than by gain-of-function mutations. Expansion of the excretory canal in these mutants might help

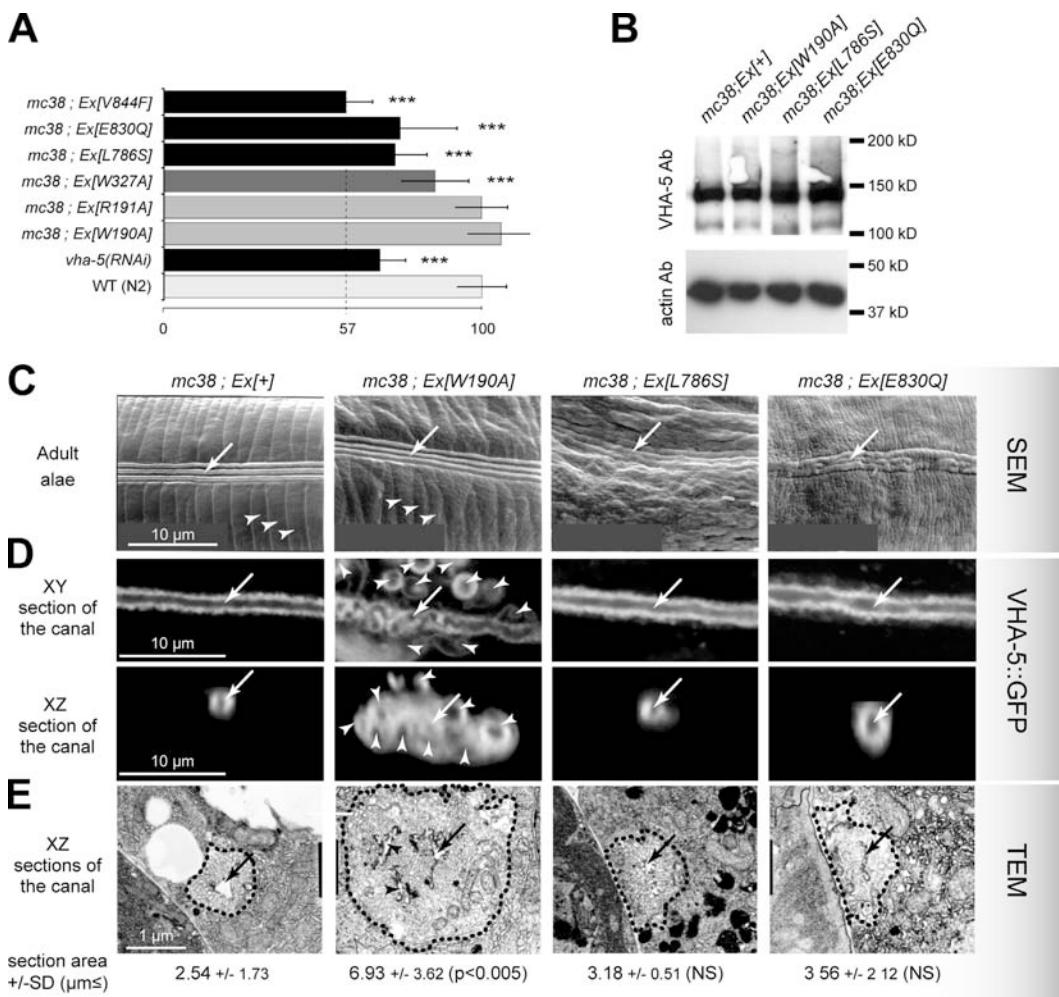


Figure 4. Genetic separation of the V0-specific and V0+V1 functions of the V0 subunit VHA-5. (A) Body length of adults at the same age (Error bars represent the SD; ***, significantly different from wild-type with $P < 0.0001$). In this and subsequent figures, *vha-5(mc38)* animals with a mutant *vha-5:gfp* or *vha-5:rfp* transgenic are noted *mc38; Ex[substitution]*. (B) Western blot analysis with VHA-5 antiserum of extracts prepared from the three main mutants described in the text. The VHA-5::GFP protein levels are comparable, relative to an actin loading control. (C) Adult outer cuticle, alae (arrows), and annuli (arrowheads) observed by SEM (genotypes indicated above images). Note the stunted alae and annuli defects induced by L786S and E830Q mutations. (D) GFP fluorescence of the VHA-5 construct in the excretory canal of similar adults (top row, single XY confocal section; bottom row, transverse XZ projection. Compare the normal lumen (arrow) in the control animal with the whorls (arrowheads) induced by the W190A mutation. (E) Excretory canal in similar adults observed by TEM, and quantification of the canal section area. Note the multiple lumens (black arrowheads) in *mc38; Ex[W190A]* animals (dotted lines outline the excretory canal). NS, not significantly different from control animals; SD, standard deviation.

to compensate for the decrease in proton-pumping efficiency. Surprisingly, animals with canal mutations did not show any proton-pumping defect in the epidermis. Possibly, proton pumping is preserved in this tissue because the “a” subunit VHA-7, which is expressed in the epidermis but not in the excretory cell (Oka et al., 2001; Pujol et al., 2001), compensates for the mutated VHA-5. In contrast, we infer that the cuticle defects induced by cuticle mutations reflect an impairment of the V0-specific secretion function, which would not be compensated by other “a” subunits, probably because they are not endowed with this specific function. The existence of various “a” subunits with possibly different functions in the epidermis is reminiscent of the difference observed in yeast between Vph1p and Stv1p (Kawasaki-Nishi et al., 2001). Lastly, we suggest that the mixed mutation W327A affects both V0+V1 and V0-specific functions. We note that cuticle mutations are located in the last

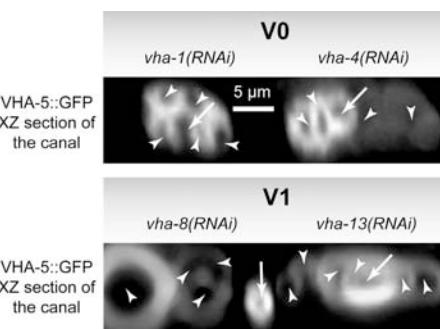


Figure 5. Knockdown of V0 and V1 subunits induces whorls in the excretory canal. VHA-5::GFP fluorescence in the excretory canal of adults after RNAi against V0 (*vha-1* and *vha-4*) or V1 (*vha-8* and *vha-13*) subunits performed during larval development. Note the presence of whorls (arrowheads; the normal lumen is outlined with arrows), as in *mc38; Ex[W190A]* animals (Fig. 4 D).

transmembrane domain or in the COOH-terminal luminal tail, whereas canal mutations are in the NH₂-terminal cytoplasmic part, which is more likely to interact with the V1 sector (Nishi and Forgac, 2002). We conclude that the V0-specific and V0+V1 functions of VHA-5 are genetically separable.

VO mediates secretion of exosomes through MVBs

If indeed the V0 sector is involved in secretion, *vha-5* cuticle mutants should accumulate secretory organelles. At low magnification, TEM through the epidermis showed that animals carrying cuticle or mixed mutations contained significantly more and larger dense organelles than wild-type adults or animals carrying canal mutations (Fig. 6 A and Fig. S3 C). At higher magnifi-

cation these organelles appeared as multivesicular bodies (MVBs; Fig. 6, B and C). MVBs are endosome-derived organelles containing 30–90 nm vesicles, which grow from early and recycling endosomes or from the trans-Golgi network and evolve into lysosomes or into secretory organelles (Raiborg et al., 2003). Hence, MVB accumulation may reflect either an endocytic/degradation pathway or a secretory defect. To distinguish between these two possibilities, we examined whether *vha-5* mutants had normal lysosomes. In addition, we compared *vha-5* defects to those induced by strong mutations in *vps-27*, *rme-8*, and *cup-5*, which are three essential genes acting at different steps along the endocytic route (Zhang et al., 2001; Treusch et al., 2004; Roudier et al., 2005). The rationale for this comparison is that if *vha-5* cuticle mutations affect endocytosis,

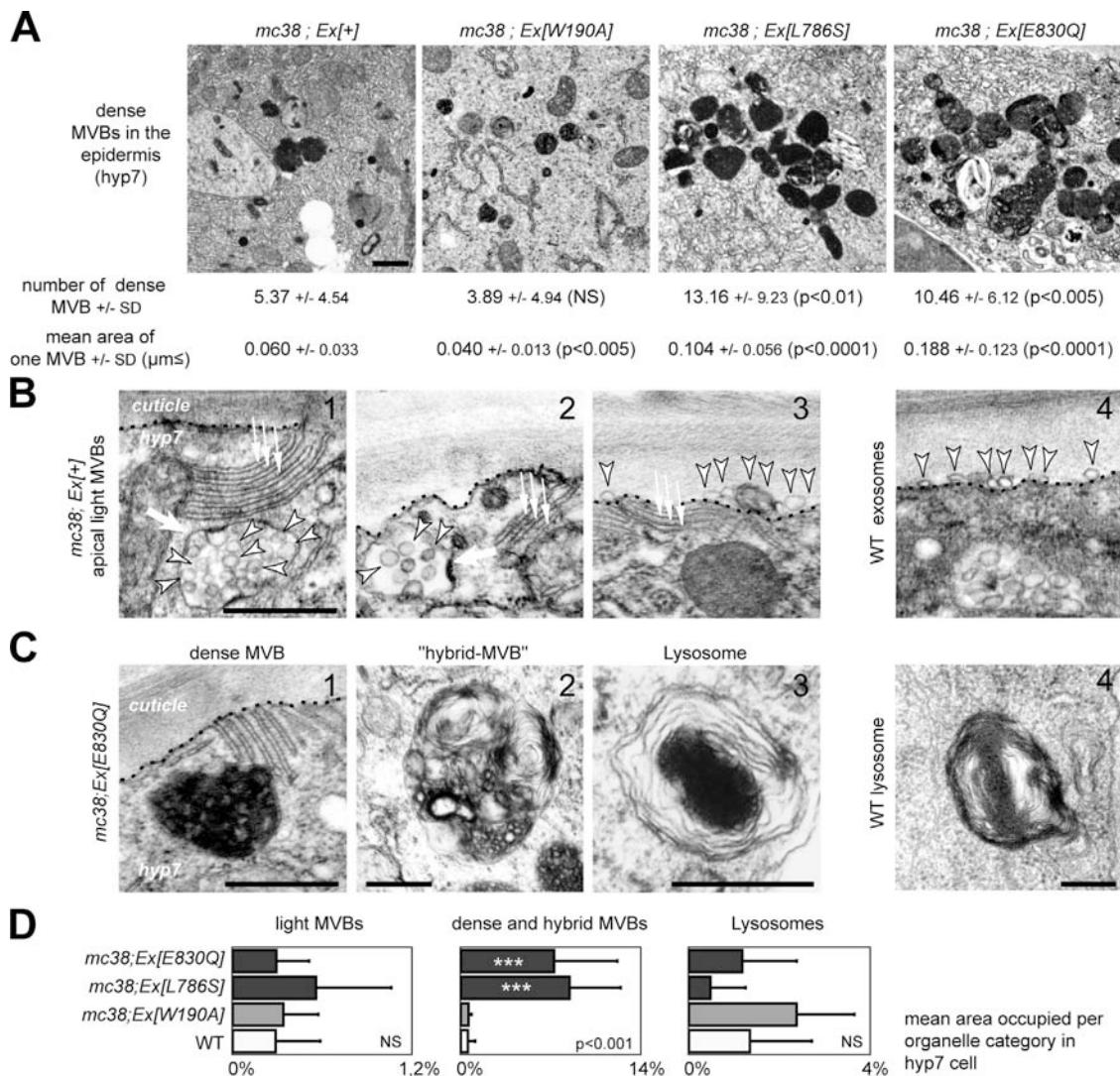


Figure 6. Cuticle mutations impair MVB-driven exosome release. TEM micrographs of the adult epidermis. (A) Dense MVBs at low magnification (genotypes indicated above images); the number and size of MVBs are quantified below images. Note that L786S and E830Q mutations increase MVB size and number. (B) Light MVBs at higher magnification in control *mc38; Ex[+]* (B1–B3) and wild-type (B4) adults. Note MVB organelles (thick arrows) with intraluminal vesicles (arrowheads), in direct apposition to membrane stacks (thin arrows) at the apical epidermal plasma membrane (B1), or in apparent fusion with the plasma membrane (B2). The presence of vesicles externally (B3 and B4) suggests that these MVBs are secretory and that intraluminal vesicles become exosomes. (C) MVBs and lysosomes in *mc38; Ex[E830Q]* (C1–C3) and wild-type (C4) adults. MVBs are electron dense (C1), yet can evolve into normal lysosomes (C2 and C3, compare to C4). Bars, 0.5 μm . (D) Quantification of endocytic organelles in *vha-5* mutants (error bars represent the SD; ***, significantly different from wild type; $P < 0.0001$). Cuticle mutants specifically accumulate dense and hybrid MVBs.

then *vps-27*, *rme-8*, or *cup-5* mutations should induce cuticle phenotypes comparable to those of *vha-5* mutants. As found in other systems (Luzio et al., 2001), we could observe in all *vha-5* mutants intermediate late endosome–lysosome compartments corresponding to enlarged MVBs with multilamellar structures (called hybrid-MVBs in the next section) and normal lysosomes, suggesting that the endocytic/degradation pathway was not qualitatively affected (Fig. 6 C). In contrast, *cup-5(ar465)* mutants accumulated large MVBs in their epidermis that did not evolve into lamellar structures (Fig. 7 A). Furthermore, *vps-27(ok579)*, *rme-8(b1023)*, and *cup-5(ar465)* mutants had normal alae, unlike *vha-5* cuticle mutants (Fig. 7, B and C). We conclude that cuticle mutations are unlikely to affect degradation, and, rather, they affect a secretory pathway.

To understand the relevance of MVB accumulation in *vha-5* mutants, we reinvestigated secretion in the wild-type *C. elegans* epidermis. In hematopoietic cells, some MVBs release their vesicle content into the extracellular space and, thus, play a role in exocytosis, in addition to their well defined role in the endosomal pathway (de Gassart et al., 2004). The vesicles released by fusion of MVBs with the plasma membrane were originally called exosomes in antigen-presenting cells. In support of the notion that secretion in the *C. elegans* epidermis involves exosomes, we observed small light MVBs containing 50–100-nm vesicles just beneath the apical plasma membrane. Moreover, we occasionally saw vesicles immediately above the plasma membrane in the inner cuticular layer, strongly suggesting that a MVB had released its intraluminal vesicles (Fig. 6 B). These MVBs were always found in the vicinity of epidermal apical membrane stacks, a structure whose role is so far unknown (White, 1988). In contrast, we rarely observed similar MVBs adjacent to the plasma membrane in cuticle mutants, or they were darker (Fig. 6 C). These data suggest that the MVB-limiting membrane can fuse with the apical membrane to release exosomes in the cuticle, and show that this process is impaired in *vha-5* cuticle mutants. It raises the possibility that the V0 sector is critical for MVB fusion with the apical membrane during exosome release.

VO mediates secretion of hedgehog-like peptides

An important expectation of the cuticle defects described so far is that we should be able to identify cuticular proteins whose secretion depends on VHA-5 activity. Cuticle proteins include collagens and Hedgehog-related peptides (McMahon et al., 2003; Zugasti et al., 2005). We found that the collagen DPY-7 was efficiently secreted in *vha-5(mc38)*–null animals, in animals carrying cuticle mutations, as well as in *che-14(mc35)* mutants (Fig. S4, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200511072/DC1>). We turned our attention onto Hedgehog-related peptides, which appeared as good candidates for three reasons. First, *vha-5* alae defects partially resemble those observed in *che-14* mutants. Second, CHE-14 is homologous to Dispatched, which is a protein required for Hedgehog release (Burke et al., 1999; Michaux et al., 2000). Third, despite the absence of a Hedgehog homologue in *C. elegans*, its genome contains several Hedgehog-related peptides required to generate a

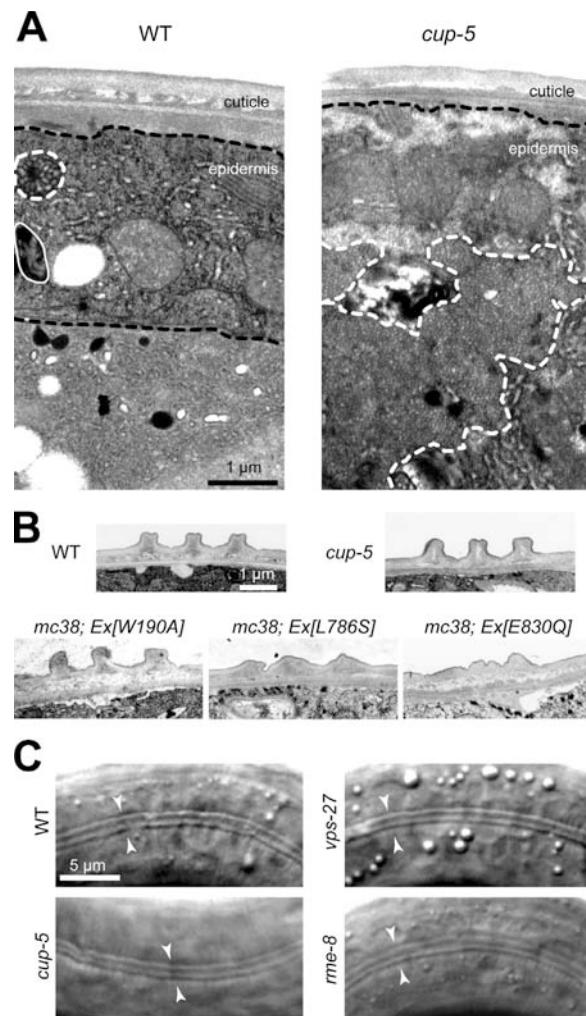


Figure 7. Fluid-phase endocytosis mutations do not affect cuticle formation. (A) Epidermis of a *cup-5(ar465)* adult visualized by TEM; note the enlarged electron-dense MVB (demarcated by dotted lines). (B) Adult alae visualized by TEM (genotypes are indicated on the left). (C) Alae of L1 larvae grown at 25°C and visualized by DIC; *vps-27(ok579)* is an L2 lethal mutation and *rme-8(b1023)* is a temperature-sensitive lethal mutation. *vps-27*, *rme-8*, and *cup-5* mutations did not affect alae formation, in contrast to *vha-5* cuticle mutations.

normal cuticle, although their precise roles remain unknown (Aspock et al., 1999; Zugasti et al., 2005).

We tagged with GFP the secreted domain of the Hedgehog-related peptides WRT-2 and -8 (Fig. 8 A and Fig. S3 E), which are expressed in the epidermis (Aspock et al., 1999). We found that animals bearing cuticle mutations, but not canal mutations, accumulated VHA-5::RFP and WRT-2::GFP or -8::GFP in discrete entities in their epidermis (Fig. 8, B and C; and Fig. S3, D and F). These entities most likely correspond to the dense and hybrid MVBs (Fig. 6, C and D) because VHA-5::RFP also colocalized (Fig. 8 C) with the MVB marker VPS-27::GFP (Roudier et al., 2005). Moreover, both VHA-5 antiserum and a GFP antiserum targeting WRT-2::GFP decorated the MVBs of cuticle mutants (Fig. 8 D and Fig. S5 B, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200511072/DC1>). Last, in wild-type nontransgenic animals, in addition to membrane stacks (Fig. 1 G), VHA-5 was found at the MVB-limiting membrane, in

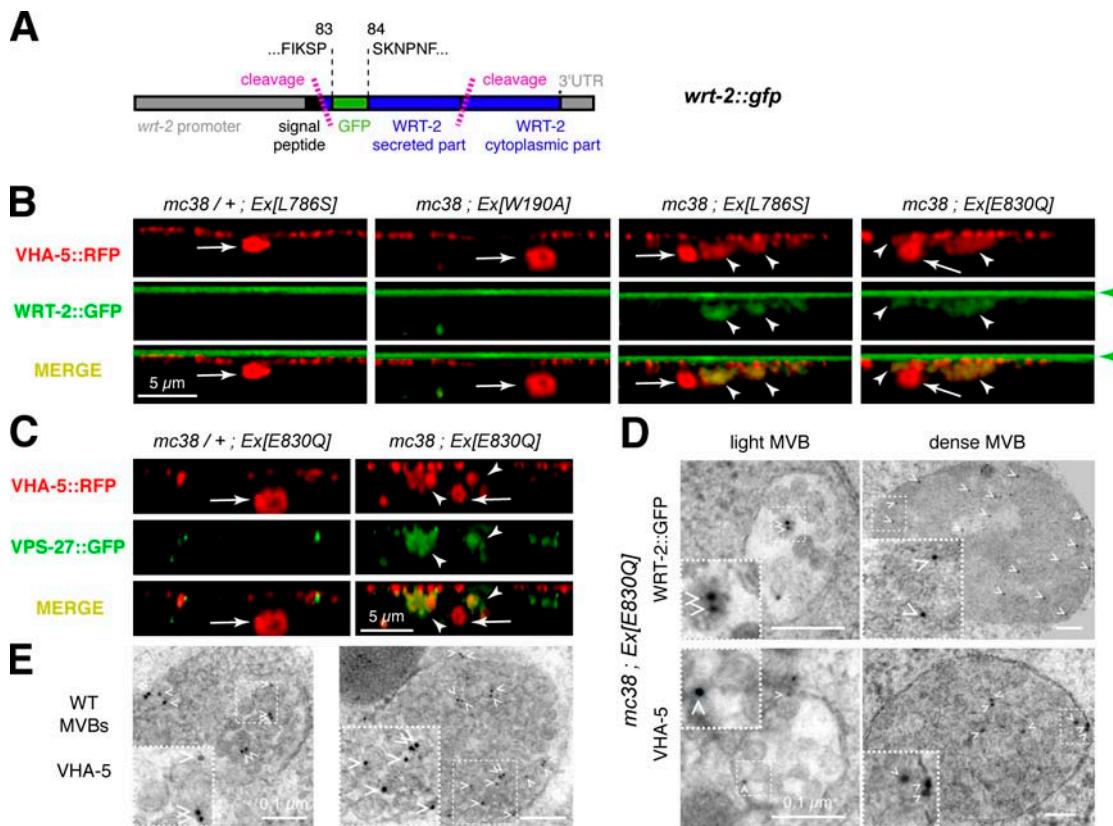


Figure 8. The V0 sector is required for the secretion of Hedgehog-related peptides through MVBs. (A) Structure of the *wrt-2:gfp* construct. GFP was inserted in frame in a nonconserved region after the signal peptide cleavage site, rather than at the COOH terminus because the related WRT-1 protein undergoes autoprocessing in vitro, like Hedgehog (Porter et al., 1996). (B) XZ projections of serial confocal sections through the epidermis of adults expressing mutant VHA-5::mRFP and WRT-2::GFP constructs (white arrowheads, VHA-5 and WRT-2 in the epidermis; white arrows, excretory canal; part of the green signal was caused by auto-fluorescence, arrow on the right). The L786S mutation induced coretention of VHA-5::mRFP and WRT-2::GFP in homozygous (third set of images), but not in heterozygous (first set of images), *vha-5*(*mc38*) animals. The mixed mutation W327A, and the cuticle mutations L786S and V844F resulted in similar coretention phenotypes [Fig. S3 D and not depicted]. (C) XZ projections of serial confocal sections through the epidermis of *mc38*; *Ex[E830Q]* adults expressing the MVB marker VPS-27::GFP construct. (D and E) Immunogold localization of VHA-5 (D and E) and WRT-2::GFP (D) in MVBs of *mc38*; *Ex[E830Q]* mutant (two different samples; D) and wild-type adults (E). Fig. S3 is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200511072/DC1>.

intraluminal vesicles, and in the cuticle (Fig. 8 E and Fig. S5 A), suggesting that it could act at different steps in the secretion of vesicle (see Discussion). Importantly, the VHA-5 protein with the substitutions L786S (Fig. 8 B) or E830Q (not depicted) could reach the plasma membrane in heterozygous *vha-5*(*mc38*)/+ animals, which strongly suggests that their intracellular retention in homozygous *mc38* animals is caused by the loss of a trafficking function rather than by misfolding. Consistently, the WRT-2/8 proteins were not retained intracellularly either in heterozygous *vha-5*(*mc38*)/+ animals, despite the presence of the L786S (Fig. 8 B), or in E830Q transgenes (not depicted). These results indicate that the V0 sector plays a key role in a specific apical secretion pathway that is taken on by Hedgehog-related proteins, but not by collagens.

Discussion

Whereas basolateral secretion is known to depend on the activity of specific complexes (AP-1B and the exocyst), no such complex has been implicated in apical secretion. In addition, although recycling endosomes appear to play a central role in

basolateral secretion, their importance in apical secretion is still under active investigation. Our characterization of mutations affecting the V-ATPase “a” subunit VHA-5 sheds new light on the apical biosynthetic secretory pathway. We could observe the fusion of MVBs with the apical plasma membrane in wild-type animals, and the subsequent release of exosomes. In contrast, we found that some VHA-5 mutations accumulate MVBs in their epidermis and prevent the secretion of Hedgehog-related proteins. Thus, we propose a model whereby apical secretion of Hedgehog-related proteins involves their incorporation into the intraluminal vesicles of MVBs, and their subsequent release when MVBs fuse with the apical plasma membrane (Fig. 9). Furthermore, we suggest that the V0 sector of the V-ATPase plays a key role in this process.

We can envision two scenarios for the role of the V0 sector. First, *vha-5* mutations affecting cuticle formation could decrease V-ATPase proton pumping along the biosynthetic secretory route to indirectly impair secretion. Consistent with this possibility, mutations in *S. cerevisiae* Vph1p (L746S, E789Q, and V803F) corresponding to the cuticle mutations (L786S, E830Q, and V844F, respectively) strongly reduce, but do not

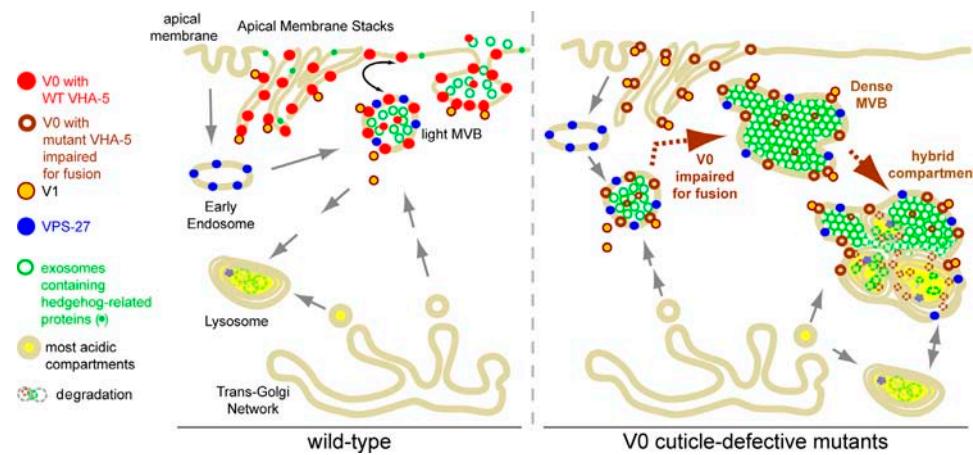


Figure 9. Model for apical secretion mediated by the V0 sector of the V-ATPase. We propose that in a wild-type animal (left) the V0 sector mediates fusion between the limiting membrane of MVBs and the apical plasma membrane (curved double-headed arrow). This model is supported by our genetic data, by the presence of VHA-5 at the apical plasma membrane (Fig. 1, E–G) and the MVB-limiting membrane (Fig. 8 E and Fig. S5 A), and by the accumulation of dense or hybrid MVBs in cuticle mutants (Fig. 8, Fig. S3 D, and Fig. S5, B–D). We expect the existence of two distinct V0 populations, some mediating secretion, others mediating proton pumping with the V1 sector. In cuticle defective *vha-5* mutants (right), most fusion events between MVBs and the plasma membrane are compromised so that MVBs grow and become denser by accumulating their content, which can nevertheless be normally degraded.

eliminate, proton pumping (Leng et al., 1996, 1998). We think, however, that this possibility is unlikely because in yeast proton uptake is not limiting for fusion of *Vph1p*-defective vacuoles (Bayer et al., 2003). Alternatively, these mutations could uncover a direct role of the V0 sector in apical exocytosis, independently of the V1 sector. Four observations strongly support this notion. First, inhibition of V1 subunits did not affect cuticle formation, although it strongly impaired osmoregulation and endocytosis. Second, we obtained specific V0 mutations inducing a strong cuticular phenotype without any apparent pumping-related defect in the excretory cell. Third, these mutations selectively affected the secretion of Hedgehog-related proteins, but not collagens. Last, strong mutations in well characterized genes blocking different steps of fluid-phase endocytosis did not affect cuticle structure. The specific accumulation of dense and hybrid MVBs, but not of light MVBs, in cuticle mutants, as well as the detection of significant amounts of WRT-2::GFP within these MVBs, suggests that VHA-5 is neither required to form MVBs nor to load them with cargo proteins. Instead, the presence of VHA-5 at the MVB-limiting and apical membranes suggests that the V0 sector could drive the fusion of MVBs with the apical membrane via the formation of V0 sectors transcomplexes between both membranes (Fig. 9), as suggested in yeast vacuole fusion and at the *D. melanogaster* synapse (Bayer et al., 2003; Hiesinger et al., 2005; Peters et al., 2001). In vertebrates, 300-nm procollagen-I rod bundles assemble in the ER and travel through the Golgi lumen (Bonfanti et al., 1998). Assuming that worm collagens are secreted this way, they would not fit into exosomes, suggesting that there are at least two distinct secretion pathways in the epidermis, one involving the V0 sector and another followed by collagens.

What could explain a common requirement for the V0 sector during the *C. elegans* apical exocytosis, yeast vacuole fusion, and *D. melanogaster* synaptic transmission? The prevailing view is that a SNAREpin complex initiates membrane fusion once a vesicle has been docked to a proper membrane

(Chernomordik and Kozlov, 2003; Jahn et al., 2003). Although the V0 sector is thought to act downstream of SNAREs in yeast and *D. melanogaster* (Peters et al., 2001; Bayer et al., 2003; Hiesinger et al., 2005), we cannot exclude that it also acts in parallel to SNAREs, at least in *C. elegans*, to dock MVBs. Another possibility is that V0 transcomplexes initiate the formation of a protein pore, as initially suggested in yeast (Peters et al., 2001). On the other hand, expansion of the fusion pore is considered as the limiting step in membrane fusion, and might require additional catalysts in vivo (Chernomordik and Kozlov, 2003). Such a role could be fulfilled by the V0 sector, either to overcome constraints caused by the big size and/or the specific lipoproteic content of *C. elegans* epidermal MVBs and yeast vacuoles, or to allow rapid synaptic transmission in *D. melanogaster* neurons (Hiesinger et al., 2005).

Irrespective of the precise role of the V0 sector in membrane fusion, our findings bear potentially important implications. First, morphogens such as Wingless and Hedgehog in *D. melanogaster*, or Sonic-Hedgehog at the mouse node, might be secreted through a similar pathway because their secretion involves particles possibly related to exosomes (Greco et al., 2001; Gallet et al., 2003; Panakova et al., 2005; Tanaka et al., 2005). A major objective will be to determine whether CHE-14 and Dispatched act in the aforementioned secretory pathway, and, if so, at which step. Second, several other cell types, such as antigen-presenting cells, reticulocytes, and some epithelial cells, can release exosomes (de Gassart et al., 2004), which might thus also require the V0 sector for their secretion. In particular, the V0 sector might be directly associated with the transmission of some infectious diseases because viruses, such as HIV and the prion protein, can be disseminated through MVBs and the exosome-releasing machinery (de Gassart et al., 2004; Fevrier et al., 2005). Likewise, the aforementioned secretory pathway could be involved in innate immunity because expression of the Hedgehog-related peptide GRD-3 is induced in *C. elegans* upon bacterial infection (Couillault et al., 2004).

Third, our findings raise the issue of the origin of the MVBS. Interestingly, the apical recycling endosomes have been recognized to play an important role in biosynthetic secretory pathways (Hoekstra et al., 2004). Future studies should reveal whether the secretory MVBS that we described could originate from this compartment.

In conclusion, our work shows that trafficking to the apical membrane of at least some lipid-modified proteins involves specific protein complexes (the V-ATPase V0 sector), much as trafficking to the basolateral membrane, and predicts a key role for MVBS in apical exocytosis.

Materials and methods

Strain maintenance and RNA interference

Worms were grown at 20°C (unless noted otherwise; Brenner, 1974). The identification of *mc37* and *mc38* as *vha-5*/F35H10.4-null mutations will be described elsewhere (the gene affected by *mc37* and *mc38* was initially named *rdy-1*; see www.wormbase.org). Marker alleles used were as follows: *cup-5(ar465)* (Treusch et al., 2004), *rme-8(b1023ts)*, *bls1[vit-2::gfp; rol-6(su1006)]* (Zhang et al., 2001), and *vps-27(ok579)/unc-24(e138) dpy-20(e1282)* (Roudier et al., 2005). The L1 alae phenotype of *rme-8(b1023ts)* was scored by allowing adults to lay eggs for 1 h at 15°C, and then transferring embryos to 25°C after egg laying. RNAi was performed using the following bacterial clones from the Wellcome-Medical Research Council library (Kamath et al., 2003): *vha-1*, III-5A20; *vha-4*, II-5J16; *vha-5*, IV-4O13; *vha-8*, IV-3108; and *vha-13*, V-9O06 (www.wormbase.org). To score L1 larvae, RNAi was induced in L4 larvae; to score adults, RNAi was induced in larvae at the L2–L3 molt. Feeding plasmids were retransformed into fresh HT115 (DE3) bacteria, selecting for tetracycline and ampicillin resistance.

Plasmids

Cloning of the *vha-5* coding sequence with a 2.8-kb promoter upstream of the GFP coding sequence in the pPD95.75 vector (Fire kit) generated a rescuing *vha-5::gfp* construct. A *vha-5::mrfp* construct was obtained by replacing the GFP with the monomeric red fluorescent protein (mRFP) coding sequence in the *vha-5::gfp* construct. A *vha-8::yfp* construct was obtained by cloning the *vha-8* coding sequence and a 3-kb promoter upstream of the YFP coding sequence in the pPD136.64 vector (Fire kit). To generate *wrt-2::gfp* and *wrt-8::gfp* constructs, we cloned *wrt-2* and -8 genomic DNA with their 5' and 3' regulatory sequences into pBSKII-derived plasmids. The GFP coding sequence was inserted in a nonconserved region of the predicted secreted peptide (Fig. 8 A and Fig. S3 D).

Site-directed mutagenesis of VHA-5::GFP

The *vha-5::gfp* construct was mutated using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). Each desired mutation, and the entire *vha-5* coding sequence of most important plasmids, was verified. Mutant plasmids were microinjected in heterozygous *vha-5(mc38)/unc-5(e53)* at 3 ng/μl, along with the marker pRF4 [*rol-6(su1006)*] at 100 ng/μl, *wrt-2::gfp* or *wrt-8::gfp* constructs at 30 ng/μl (when relevant), and pBSKII plasmid at up to 200 ng/μl. Absence of *unc-5* animals in the progeny was used as a criterion for rescue. mRFP versions for the mutations W190A, R191A, W327A, L78S, E830Q, and V844F were obtained from GFP derivatives without PCR amplification and resulted in similar phenotypes. At least two independent extrachromosomal lines were initially examined for each mutation. More detailed analysis was performed on a representative line.

VHA-5 antiserum, Western blots, and immunofluorescence

VHA-5 polyclonal antibodies were raised in rabbits injected with a purified GST fusion protein containing VHA-5 residues I29–M302, which was obtained by cloning a fragment amplified from the cDNA *yk458f4* (a gift from Y. Kohara, National Institute of Genetics, Mishima, Japan) into the vector pGEX-2T. Total worm extracts were solubilized in 8 M urea/2% SDS by sonication, before 8% acrylamide gel electrophoresis and Western blotting. VHA-5 antiserum was used at 1:2,000, the actin monoclonal antibody (act-2D7; Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire collection) at 1:4,000; primary antibodies were revealed with a Super-Signal kit (Pierce Chemical Co.). Immunofluorescence was performed using the VHA-5 antiserum at 1:1,000 dilution and the DPY-7 monoclonal antibody

(gift from I. Johnstone, Wellcome Centre for Molecular Parasitology, Glasgow, Scotland) at a 1:50 dilution.

DIC and confocal microscopy

Animals were mounted on 4% agarose pads in M9, anaesthetized with 0.2% tricaine/0.02% tetramisole in M9. For DIC imaging, we used a microscope (AxioPlan; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) coupled to a camera (CoolSNAP; Roper Scientific) under a 100× objective (PlanApo; Leica). For Fig. 4 A, we took at least 40 pictures of adult worms per strain and used ImageJ (National Institutes of Health) to measure the distance between the rectum and the grinder. Confocal images were captured on a confocal microscope (SP2-AOBS; Leica), scanning every 122 nm for XZ sections through a 100× objective with a 2.15× zoom [Fig. 8, B and C; and Fig. S3 D] or a 4× zoom [Fig. 4 E and Fig. 5]. Images were processed with the Tcstk software (McMahon et al., 2001) and edited using Photoshop 7.0 (Adobe). Microscopes were in an air-conditioned room (20–21°C).

TEM and SEM

L4 larvae were transferred onto fresh plates for 24 ± 2 h at 20°C before fixation. For TEM, but not for SEM, animals were sectioned and fixed for at least 24 h in 2.5% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde/0.1 M sodium cacodylate, pH 7.2, at 4°C, and then postfixed for 5 h with 2% osmium tetroxide in the same buffer at 4°C, dehydrated in graded alcohol/water mixes, and embedded in Epon. Ultrathin 70-nm sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Sections were observed with a microscope (CM12; Philips) operating at 60 kV. Quantification of the excretory canal section area was obtained using the Metamorph software after scanning images were captured at a 17,000× magnification. Quantification of MVBS was performed on 3,600×-magnified images. Quantification of the mean area occupied by organelles (Fig. 6 D) was obtained using ImageJ and dividing the total surface of each organelle subtype by the cytoplasmic surface of the hyp7 epidermis section. At least four animals per mutant strain were examined, and more than nine pictures per animal from different ultrathin sections were analyzed. For SEM, animals were postfixed for 1 h with 2% osmium tetroxide at 4°C, dehydrated, and critical point dried in hexamethyldisilazane. Fixed animals were mounted on stubs, coated with palladium, and observed through a microscope (XL20; Philips). At least 20 animals per strain were analyzed.

High pressure freezing and immunogold labeling

Adult worms were frozen with a high pressure freezing apparatus (EMPACT-2; Leica) in 20% BSA/M9 medium. Cryosubstitution was conducted as in Muller-Reichert et al. (2003). Ultrathin sections were collected on formvar-carbon-coated copper grids and processed for immunogold labeling. Blocking was performed in PBS/glycine 150 mM, and then in PBS/1% BSA/0.1% Cold Water Fish Skin Gelatin (CWFSG; Aurion) for 30 min. Rabbit anti-VHA-5 at 1:1,000 and rabbit anti-GFP at 1:500 (ab6556; AbCam) were incubated for 1 h in PBS/0.1% CWFSG. 10 nm protein A-coupled gold beads (1:50; University Medical Center, Utrecht, Netherlands) were incubated for 1 h in PBS/0.1% CWFSG. Postfixation was achieved in 2.5% glutaraldehyde, contrasted by uranyl acetate/lead citrate. Images were acquired at 60 kV on a microscope (Morgagni; FEI) with a charge-coupled device camera (Megaview III; Soft Imaging System).

Online supplemental material

Fig. S1 provides a control for Fig. 2 B, showing that RNAi against *vha-5* was efficient. In addition, it presents the yolk endocytosis defects induced by the loss of V-ATPase activity (yolk proteins are produced by the intestine and are essential for embryonic development); it suggests that RNAi treatment against V0 and V1 subunits was equally effective, and contributes to establish that alae differences described in Fig. 2 are meaningful. Fig. S2 summarizes the main phenotypes observed in *vha-5(mc38)* animals carrying transgenes with the mutations shown in Fig. 3. Fig. S3 presents the excretory canal, cuticle and MVBS phenotypes induced by the mutations R191A, W327A and V844A, which are discussed but not illustrated in the main text, and shows that WRT-8::GFP accumulates in *mc38; Ex[vha-5(E830Q)::rfp]* animals; it should be viewed along with Figs. 4, 6 and 8. Fig. S4 shows that secretion of the collagen DPY-7 is not affected by *vha-5* or *che-14* mutations. Fig. S5 provides larger pictures and controls for the immunogold experiments shown in Fig. 8. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200511072/DC1>.

We are grateful to Guillaume Belliard, Grégoire Michaux, and Emmanuel Solirakis for their help in isolating *vha-5* mutations, and to Satis Sookharea for expert assistance in producing VHA-5 antiserum. We thank the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire Imaging Facility for help with

confocal and EM, and Patrick Schultz for access to the EMPACT2. We thank Andy Fire, Yuji Kohara, Johnny Fares, Barth Grant, Iain Johnstone, Renaud Legouis, and the CGC for reagents. We thank Jean-Louis Bessereau, Thierry Galli, Pierre Gönczy, Nathalie Pujol, and Christelle Gally for critical reading of the manuscript.

S. Liégeois and A. Benedetto were supported by fellowships from the Ministère de la Recherche, and from the FRM. This work was supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and by a grant from the Ministère de la Recherche (programme ACI).

Submitted: 17 November 2005

Accepted: 15 May 2006

References

- Amara, S.G., and M.J. Kuhar. 1993. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:73–93.
- Ang, A.L., T. Taguchi, S. Francis, H. Folsch, L.J. Murrells, M. Pypaert, G. Warren, and I. Mellman. 2004. Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J. Cell Biol.* 167:531–543.
- Aspock, G., H. Kagoshima, G. Niklaus, and T.R. Burglin. 1999. *Caenorhabditis elegans* has scores of hedgehog-related genes: sequence and expression analysis. *Genome Res.* 9:909–923.
- Bayer, M.J., C. Reese, S. Buhler, C. Peters, and A. Mayer. 2003. Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca²⁺-releasing channel. *J. Cell Biol.* 162:211–222.
- Beronja, S., P. Laprise, O. Papoulas, M. Pellikka, J. Sisson, and U. Tepass. 2005. Essential function of *Drosophila* Sec6 in apical exocytosis of epithelial photoreceptor cells. *J. Cell Biol.* 169:635–646.
- Blott, E.J., and G.M. Griffiths. 2002. Secretory lysosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:122–131.
- Bonfanti, L., A.A. Mironov Jr., J.A. Martinez-Menarguez, O. Martella, A. Fusella, M. Baldassarre, R. Buccione, H.J. Geuze, A.A. Mironov, and A. Luini. 1998. Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell*. 95:993–1003.
- Bonifacino, J.S., and J. Lippincott-Schwartz. 2003. Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:409–414.
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77:71–94.
- Burke, R., D. Nellen, M. Bellotto, E. Hafen, K.A. Senti, B.J. Dickson, and K. Basler. 1999. Dispatchin, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell*. 99:803–815.
- Cheong, K.H., D. Zucchini, E.E. Schneeberger, and K. Simons. 1999. VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:6241–6248.
- Chernomordik, L.V., and M.M. Kozlov. 2003. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 72:175–207.
- Choi, K.Y., Y.J. Ji, B.K. Dhakal, J.R. Yu, C. Cho, W.K. Song, and J. Ahnn. 2003. Vacuolar-type H⁺-ATPase E subunit is required for embryogenesis and yolk transfer in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. 311:13–23.
- Couillault, C., N. Pujol, J. Reboul, L. Sabatier, J.-F. Guichou, Y. Kohara, and J.J. Ewbank. 2004. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat. Immunol.* 5:488–494.
- de Gassart, A., C. Geminard, D. Hoekstra, and M. Vidal. 2004. Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? *Traffic*. 5:896–903.
- Fevrier, B., D. Vilette, H. Laude, and G. Raposo. 2005. Exosomes: a bubble ride for prions? *Traffic*. 6:10–17.
- Fiedler, K., F. Lafont, R.G. Parton, and K. Simons. 1995. Annexin XIIIb: a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane. *J. Cell Biol.* 128:1043–1053.
- Folsch, H., H. Ohno, J.S. Bonifacino, and I. Mellman. 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell*. 99:189–198.
- Gallet, A., R. Rodriguez, L. Ruel, and P.P. Therond. 2003. Cholesterol modification of hedgehog is required for trafficking and movement, revealing an asymmetric cellular response to hedgehog. *Dev. Cell*. 4:191–204.
- Grant, B., and D. Hirsh. 1999. Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol. Biol. Cell*. 10:4311–4326.
- Greco, V., M. Hannus, and S. Eaton. 2001. Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell*. 106:633–645.
- Grindstaff, K.K., C. Yeaman, N. Anandasabapathy, S.C. Hsu, E. Rodriguez-Boulan, R.H. Scheller, and W.J. Nelson. 1998. Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells. *Cell*. 93:731–740.
- Hiesinger, P.R., A. Fayyazuddin, S.Q. Mehta, T. Rosenmund, K.L. Schulze, R.G. Zhai, P. Verstreken, Y. Cao, Y. Zhou, J. Kunz, and H.J. Bellen. 2005. The v-ATPase V0 subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*. *Cell*. 121:607–620.
- Hoekstra, D., D. Tytela, and S.C. van IJzendoorn. 2004. The subapical compartment: a traffic center in membrane polarity development. *J. Cell Sci.* 117:2183–2192.
- Hua, W., D. Sheff, D. Toomre, and I. Mellman. 2006. Vectorial insertion of apical and basolateral membrane proteins in polarized epithelial cells revealed by quantitative 3D live cell imaging. *J. Cell Biol.* 172:1035–1044.
- Jahn, R., T. Lang, and T.C. Sudhof. 2003. Membrane fusion. *Cell*. 112:519–533.
- Kamath, R.S., A.G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, et al. 2003. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*. 421:231–237.
- Kawasaki-Nishi, S., T. Nishi, and M. Forgac. 2001. Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa a-subunit differ in coupling efficiency and in vivo dissociation. *J. Biol. Chem.* 276:17941–17948.
- Kurzchalia, T.V., P. Dupree, R.G. Parton, R. Kellner, H. Virta, M. Lehnert, and K. Simons. 1992. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* 118:1003–1014.
- Langevin, J., M.J. Morgan, J.B. Sibarita, S. Aresta, M. Murthy, T. Schwarz, J. Camonis, and Y. Bellaiche. 2005. *Drosophila* exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane. *Dev. Cell*. 9:355–376.
- Leng, X.H., M.F. Manolson, Q. Liu, and M. Forgac. 1996. Site-directed mutagenesis of the 100-kDa subunit (Vph1p) of the yeast vacuolar (H⁺)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271:22487–22493.
- Leng, X.H., M.F. Manolson, and M. Forgac. 1998. Function of the COOH-terminal domain of Vph1p in activity and assembly of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 273:6717–6723.
- Lock, J.G., and J.L. Stow. 2005. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol. Biol. Cell*. 16:1744–1755.
- Luzio, J.P., B.M. Mullock, P.R. Pryor, M.R. Lindsay, D.E. James, and R.C. Piper. 2001. Relationship between endosomes and lysosomes. *Biochem. Soc. Trans.* 29:476–480.
- Manninen, A., P. Verkade, S. Le Lay, J. Torkko, M. Kasper, M. Füllekrug, and K. Simons. 2005. Caveolin-1 is not essential for biosynthetic apical membrane transport. *Mol. Cell. Biol.* 25:10087–10096.
- McMahon, L., R. Legouis, J.L. Vonesch, and M. Labouesse. 2001. Assembly of *C. elegans* apical junctions involves positioning and compaction by LET-413 and protein aggregation by the MAGUK protein DLG-1. *J. Cell Sci.* 114:2265–2277.
- McMahon, L., J.M. Muriel, B. Roberts, M. Quinn, and I.L. Johnstone. 2003. Two sets of interacting collagens form functionally distinct substructures within a *Caenorhabditis elegans* extracellular matrix. *Mol. Biol. Cell*. 14:1366–1378.
- Michaux, G., A. Gangsmuller, C. Hindelang, and M. Labouesse. 2000. CHE-14, a protein with a sterol-sensing domain, is required for apical sorting in *C. elegans* ectodermal epithelial cells. *Curr. Biol.* 10:1098–1107.
- Muller-Reichert, T., H. Hohenberg, E.T. O'Toole, and K. McDonald. 2003. Cryoimmobilization and three-dimensional visualization of *C. elegans* ultrastructure. *J. Microsc.* 212:71–80.
- Nelson, F.K., and D.L. Riddle. 1984. Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery. *J. Exp. Zool.* 231:45–56.
- Nishi, T., and M. Forgac. 2002. The vacuolar (H⁺)-ATPases—nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:94–103.
- Nurish, S.J. 2002. An overview of *C. elegans* trafficking mutants. *Traffic*. 3:2–10.
- Oka, T., T. Toyomura, K. Honjo, Y. Wada, and M. Futai. 2001. Four subunit a isoforms of *Caenorhabditis elegans* vacuolar H⁺-ATPase. Cell-specific expression during development. *J. Biol. Chem.* 276:33079–33085.
- Paladino, S., D. Sarnataro, R. Pillich, S. Tivodar, L. Nitsch, and C. Zurzolo. 2004. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J. Cell Biol.* 167:699–709.
- Paladino, S., T. Pocard, M.A. Catino, and C. Zurzolo. 2006. GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 172:1023–1034.
- Panakova, D., H. Sprong, E. Marois, C. Thiele, and S. Eaton. 2005. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature*. 435:58–65.

- Peters, C., M.J. Bayer, S. Buhler, J.S. Andersen, M. Mann, and A. Mayer. 2001. Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature*. 409:581–588.
- Porter, J.A., S.C. Ekker, W.J. Park, D.P. von Kessler, K.E. Young, C.H. Chen, Y. Ma, A.S. Woods, R.J. Cotter, E.V. Koonin, and P.A. Beachy. 1996. Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell*. 86:21–34.
- Puertollano, R., F. Martin-Belmonte, J. Millan, M.C. de Marco, J.P. Albar, L. Kremer, and M.A. Alonso. 1999. The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 145:141–151.
- Pujol, N., C. Bonnerot, J.J. Ewbank, Y. Kohara, and D. Thierry-Mieg. 2001. The *Caenorhabditis elegans unc-32* gene encodes alternative forms of a vacuolar ATPase a subunit. *J. Biol. Chem.* 276:11913–11921.
- Raiborg, C., T.E. Rusten, and H. Stenmark. 2003. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:446–455.
- Roberts, B., C. Clucas, and I.L. Johnstone. 2003. Loss of SEC-23 in *Caenorhabditis elegans* causes defects in oogenesis, morphogenesis, and extracellular matrix secretion. *Mol. Biol. Cell*. 14:4414–4426.
- Rodriguez-Boulan, E., G. Kreitzer, and A. Musch. 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:233–247.
- Roudier, N., C. Lefebvre, and R. Legouis. 2005. CeVPS-27 is an endosomal protein required for the molting and the endocytic trafficking of the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in *Caenorhabditis elegans*. *Traffic*. 6:695–705.
- Sapiro, M.R., M.A. Hilliard, M. Cermola, R. Favre, and P. Bazzicalupo. 2005. The Zona Pellucida domain containing proteins, CUT-1, CUT-3 and CUT-5, play essential roles in the development of the larval alae in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 282:231–245.
- Satoh, A.K., J.E. O'Tousa, K. Ozaki, and D.F. Ready. 2005. Rab11 mediates post-Golgi trafficking of rhodopsin to the photosensitive apical membrane of *Drosophila* photoreceptors. *Development*. 132:1487–1497.
- Schuck, S., and K. Simons. 2004. Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J. Cell Sci.* 117:5955–5964.
- Tanaka, Y., Y. Okada, and N. Hirokawa. 2005. FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature*. 435:172–177.
- TerBush, D.R., and P. Novick. 1995. Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 130:299–312.
- Treusch, S., S. Knuth, S.A. Slaugenhaupt, E. Goldin, B.D. Grant, and H. Fares. 2004. *Caenorhabditis elegans* functional orthologue of human protein h-mucolipin-1 is required for lysosome biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:4483–4488.
- White, J. 1988. The anatomy. In *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Monograph 17. W.B. Wood and the Community of *C. elegans* Researchers, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 81–122.
- Whyte, J.R., and S. Munro. 2002. Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J. Cell Sci.* 115:2627–2637.
- Yeaman, C., K.K. Grindstaff, J.R. Wright, and W.J. Nelson. 2001. Sec6/8 complexes on trans-Golgi network and plasma membrane regulate late stages of exocytosis in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 155:593–604.
- Zhang, Y., B. Grant, and D. Hirsh. 2001. RME-8, a conserved J-domain protein, is required for endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell*. 12:2011–2021.
- Zugasti, O., J. Rajan, and P.E. Kuwabara. 2005. The function and expansion of the Patched- and Hedgehog-related homologs in *C. elegans*. *Genome Res.* 15:1402–1410.

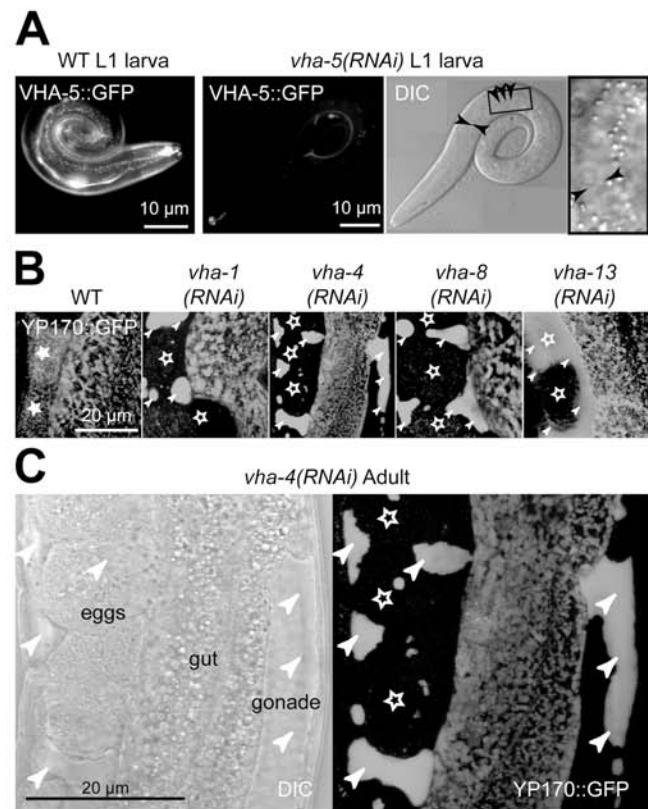


Figure S1. The V-ATPase is required for endocytosis. (A) GFP fluorescence of a control L1 larva carrying a vha-5::gfp transgene (WT), and after RNAi against vha-5 (*vha-5*[RNAi]). The RNAi treatment almost completely removed the fluorescence in this larva and prevented alae formation (see magnified view of the boxed area in the right DIC image; arrowheads point out the area where alae should be found), which can be contrasted with the control shown in Fig. 2 D using RNAi against vha-8. (B) In wild-type adults (WT), the yolk protein reporter YP170::GFP (integrated transgene *bls1*) is produced by the intestine and endocytosed by oocytes (filled stars; Grant and Hirsh, 1999). When RNAi against the V0 (*vha-1* and -4) or V1 (*vha-8* and -13) subunits was induced during larval development, YP170::GFP was normally secreted by the intestine; however, it accumulated in the pseudocoelom (arrowheads), resulting in a depletion of YP170::GFP from oocytes and embryos (empty stars). Thus, RNAi-mediated depletion of V0 and V1 subunits was equally effective in impairing the early steps of endocytosis. (C) Enlargement and phase-contrast view of the *vha-4* RNAi-treated adult shown in B.

Mutation	let	No Rol	Dpy	alae score /5	exc. def.	Mutation	let	No Rol	Dpy	alae score /5	exc. def.
control				4.9 (n=43)		S522P				4.95 (n=21)	
N041A				5 (n=10)		W529A	x				
R049A				4.9 (n=11)		F538A				5 (n=15)	
R056A				4.9 (n=19)		K545A	x				
R057A				4.9 (n=11)		F557A				4.8 (n=18)	
Y058A				4.9 (n=54)		N565A				4.95 (n=18)	x
E107A				4.5 (n=50)		N569A				4.3 (n=19)	
E129A				4.8 (n=74)		D574A				4.7 (n=21)	x
R187A				4.2 (n=16)		F579A				4.8 (n=18)	x
W190A				4.75 (n=21)	xx	F585A				5 (n=17)	x
R191A				4.5 (n=20)	xx	F590A				4.8 (n=16)	x
H194R				4.7 (n=38)		Y592F				4.8 (n=18)	
N311A				4.7 (n=23)		K600A	x				
W327A	x	x		2.5 (n=41)	xx	W601A				4.7 (n=21)	x
K372A				4.6 (n=27)		L626A				4.85 (n=21)	
T374A				4.7 (n=22)		F633A				4.5 (n=23)	
C408V				4.5 (n=15)		Y665A				4.95 (n=16)	x
D412N				4.6 (n=59)		Q668A				4.8 (n=26)	x
E430A				4.8 (n=24)	x	K690A				4.5 (n=26)	x
E441A				4.75 (n=16)		H769R	x			4.1 (n=13)	x
F447A				4.9 (n=16)		R775E	x				
R450A				3.8 (n=19)	x	R775K	x				
Y451A				4.8 (n=15)	x	L779S	x				
L455A				4.8 (n=16)		H783A				4.45 (n=22)	
H462Y				4.7 (n=23)		L786S	x	x		0.75 (n=48)	
A463T				4.9 (n=12)		W791A				4.3 (n=15)	x
W482A	x					E830Q	x	x		2.2 (n=32)	
Y486A				4.7 (n=14)	x	R840K	x				
						V844F	x	x		2.4 (n=47)	

Figure S2. Summary of the main phenotypes induced by vha-5 substitutions. For each mutation (first column), the table indicates whether it fails to rescue the lethality induced by vha-5(mc38) (x in the let column, lethality; no indication, a viable animal), whether transgenic animals failed to exhibit the Rol phenotype imparted by the coinjection marker pRF4 (x in No Rol column, no Rol phenotype; no indication, animal exhibits Rol phenotype) or were dumpy (x in Dpy column), whether alae were normal (scoring is outlined in the bottom drawing; normal alae is scored 5), and whether the excretory canal appeared normal under DIC and GFP fluorescence (xx, obviously abnormal; x, slightly abnormal; no indication, apparently normal). Dumpiness is frequently associated with cuticle abnormalities; likewise, the Rol phenotype is not seen when animals become dumpy. At least 30 animals per transgenic line, and at least two independent transgenic lines, were initially observed for each mutation, even if fewer were scored in more detail. Yeast Vph1p mutations in positions equivalent to D412N and H769R, which rescue vha-5(mc38), abolish Vph1p ATPase and proton pump activities (D425N and H729R, respectively), whereas those in positions equivalent to L786S, E830Q, and V844F, which are further characterized in this work, assemble normally and have 5-20% normal activity (L746S, E789Q, and V803F, respectively; Leng et al., 1996, 1998).

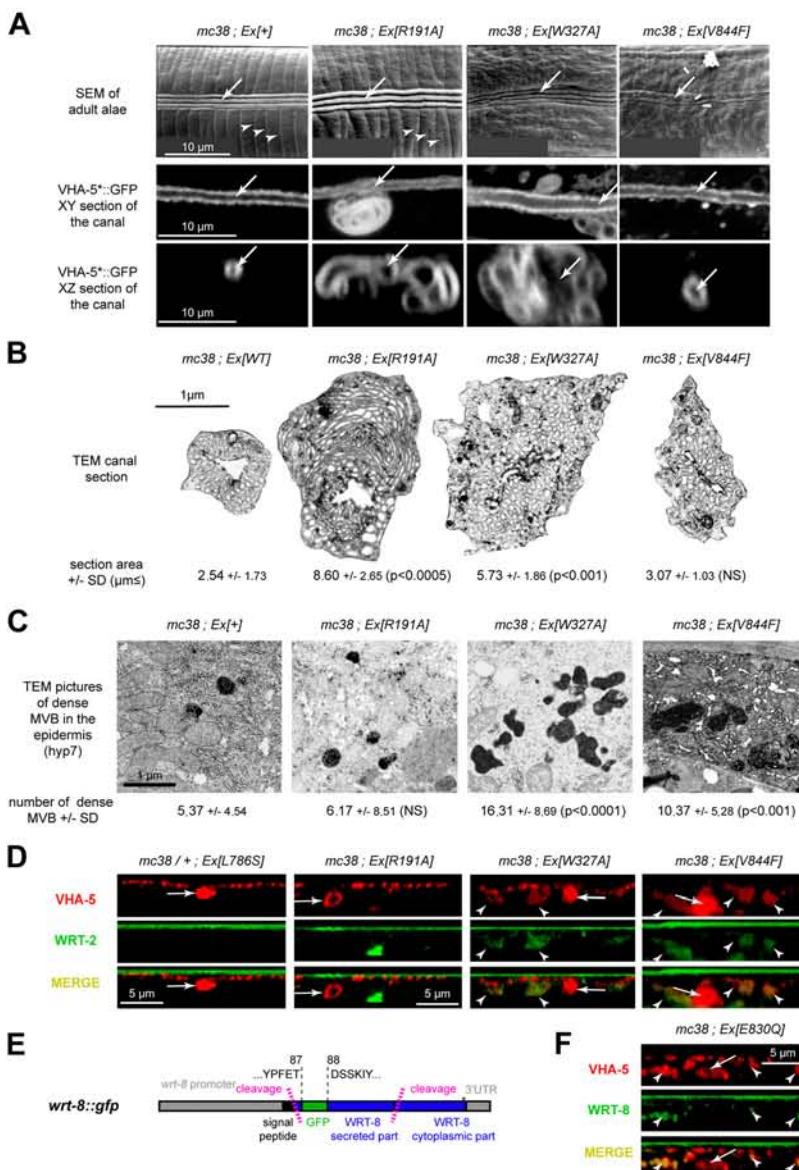


Figure S3. Defects observed in R191A, W327A, and V844F mutants, and WRT-8::GFP secretion defects in cuticle-mutants. (A) The mixed-mutation W327A and the cuticle-mutation V844F induced alae defects (first row) in the same way as the cuticle-mutations L786S and E830Q (Fig. 4), whereas the mutation R191A had a normal epidermis and cuticle. The mixed-mutation W327A and the canal-mutation R191A induced whorls and had an enlarged excretory canal (rows 2 and 3), much as the canal-mutation W190 (see Fig. 4) and as seen after RNAi against vha-1, -4, -8, and -13 (Fig. 5). Arrows in SEM images, alae; arrowheads in SEM images, annuli; arrows in XY and XZ sections, excretory canal. (B) TEM confirms that the canal-mutation R191A and the mixed-mutation W327A significantly increased the excretory canal diameter, compared to wild-type or the mutation V844F. (C) The mixed-mutation W327A and the cuticle-mutation V844F, but not the canal-mutation R191A, induced significant accumulation of MVBs, similar to the cuticle-mutations L786S and E830Q (Fig. 6). (D) The mixed-mutation W327A and the cuticle-mutation V844F, but not the canal-mutation R191A, induced coretention of the mutant VHA-5::RFP and WRT-2::GFP proteins in the epidermis (arrowheads; arrow, excretory canal), much as the cuticle-mutations L786S and E830Q (Fig. 8). (E) Structure of wrt-8::gfp construct. The GFP coding sequence was inserted in frame in a nonconserved region localized after the signal peptide cleavage-site, as for the wrt-2::gfp construct (Fig. 8 A). (F) XZ projection of serial confocal sections through the epidermis of *mc38 ; Ex[E830Q]* adults expressing the WRT-8::GFP construct. Note that VHA-5 and WRT-8 accumulate in the epidermis (arrows; arrowheads, excretory canal; see also Fig. 8 B for parallel observations on WRT-2).

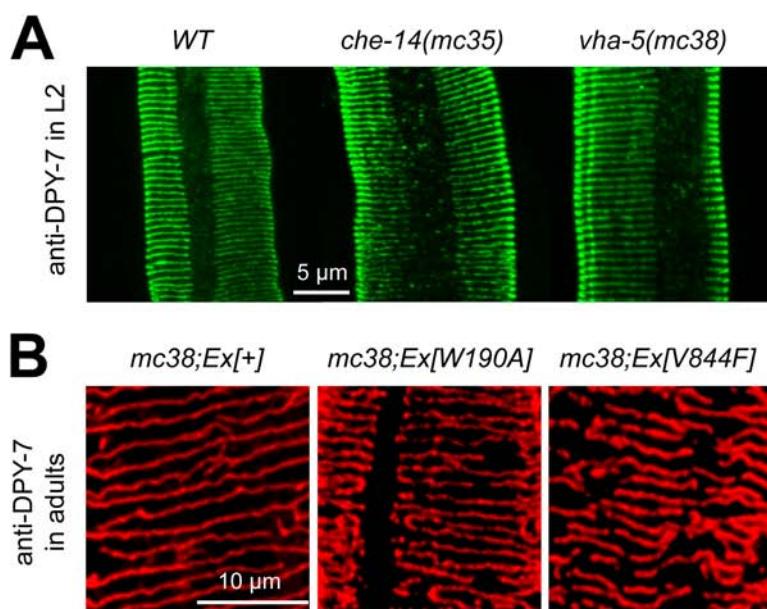


Figure S4. Secretion of collagens does not depend on the V0 sector. (A) The DPY-7 collagen is properly secreted in *che-14*- and *vha-5*-null mutants and does not accumulate in the cytoplasm, e.g., as seen in a *sec-23* mutant, which is an essential component of COPII vesicles required for ER-Golgi transport (Roberts et al., 2003). (B) DPY-7 collagen is also properly secreted in *vha-5(mc38)* animals expressing mutant *vha-5* transgenes, although the organization of collagen fibers can be slightly disorganized (*mc38; Ex[V844F]*), probably because other components that organize the cuticle were not properly secreted.

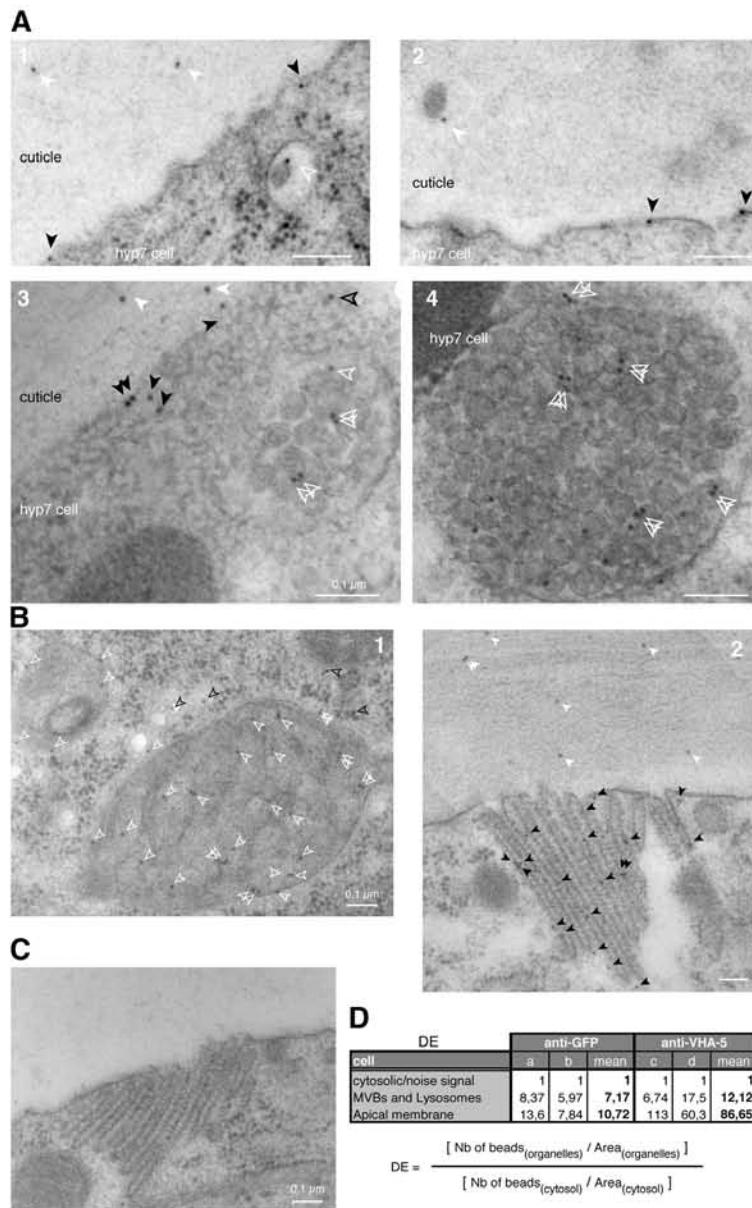


Figure S5. Quantification and specificity of anti-VHA-5 and anti-GFP immunogold images. (A) Immunogold staining using a VHA-5 antiserum in wild-type adults. (A1 and A2) Gold beads were frequently observed in the cuticle (white arrowheads) and at the apical plasma membrane (filled black arrowheads); note that we could occasionally find vesicle-like bead-bound particles in the cuticle (A2). (A3 and A4) High-magnification pictures of light (A3) and dense (A4) MVBs. White arrowheads, cuticular staining; black arrowheads, apical membrane staining; empty white arrowheads, intraorganelle staining; empty black arrowhead, cytosolic or background staining. Note that gold beads could be seen within MVB intraluminal vesicles, and at the MVB limiting membrane. (B) Immunogold staining using a GFP antiserum in the cuticle-defective mutant mc38; Ex[E830Q]. (B1) Gold beads were found in hybrid-MVBs (A1) and at the apical membrane stacks (A2). Arrowheads are as in A. (C) Control immunogold staining of the cuticle-defective mutant mc38; Ex[E830Q] in the absence of primary antibody. Note that the membrane stack is not stained by protein A gold beads. (D) Quantification of bead density enrichment (DE) in the endolysosomal compartments and at the apical membrane of mc38; Ex[E830Q] adults. As outlined in the formula, the number of beads at these specific locations was calculated relative to cytosolic/noise signal. For each antibody, two epidermal sections where reconstructed from high magnification pictures. Note that VHA-5 is very strongly enriched at the apical membrane stacks compared with WRT-2::GFP, which may correspond to the dotted structures observed via VHA-5::mRFP fluorescence (Fig. 1 C) and by immunofluorescence (Fig. 1 E).

3 A la recherche de nouveaux acteurs de la sécrétion épidermique apicale.

Au lancement de la thématique initiée au laboratoire de Michel Labouesse par Grégoire Michaux, et poursuivie par Samuel Liégeois et moi-même, les connaissances sur le trafic intracellulaire dans l'épiderme de *C. elegans* étaient très lacunaires. En particulier, les orthologues d'acteurs protéiques identifiés et bien caractérisés dans d'autres systèmes étaient parfaitement inconnus. Les patrons d'expression de certains candidats évidents ainsi que l'existence d'un ou de plusieurs orthologues étaient partiellement connus, mais n'avait pas fait l'objet de travaux approfondis et publiés. C'est pourquoi, j'ai tenté, en parallèle des travaux présentés précédemment, de créer des outils génétiques et moléculaires, et d'identifier voire d'initier la caractérisation de gènes potentiellement impliqués dans la sécrétion épidermique apicale chez *C. elegans*. Cette recherche a été enrichie au fur et à mesure de la progression des autres projets, et des travaux réalisés dans d'autres laboratoires comme ceux de Jonathan Ewbank (pour les aspects concernant la réponse immunitaire innée), de Renaud Legouis (pour ce qui concerne les compartiments endosomaux et les protéines VPS de classe E), de Patricia Kuwabara et de Thomas Bürglin (pour les données sur la voie Hedgehog chez *C. elegans*).

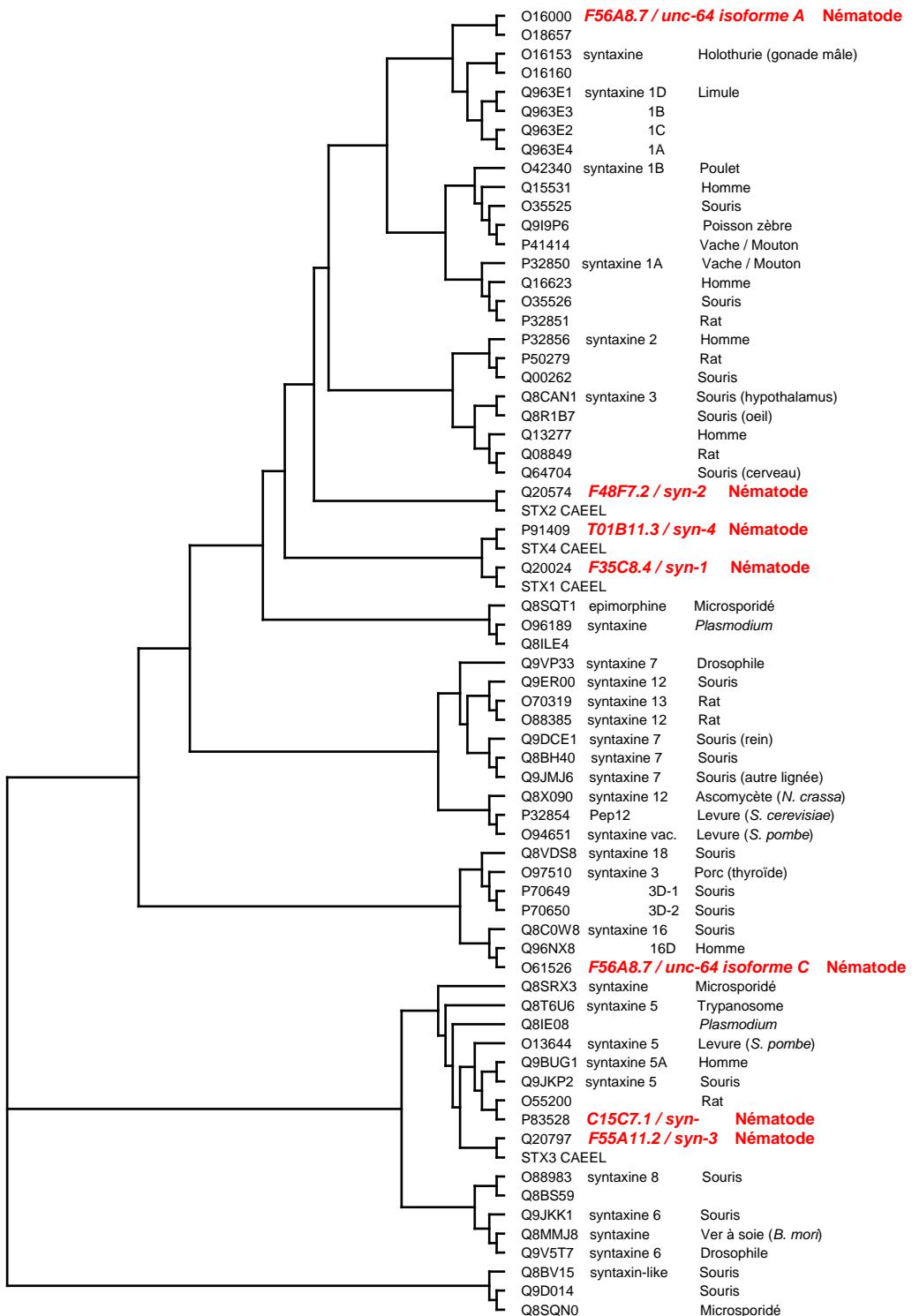
3.1 Quelles sont les syntaxines de la membrane plasmique épidermique ?

3.1.1 Introduction.

Différents aspects du travail engagé avec Samuel Liégeois sur la sécrétion apicale et le rôle de la V-ATPase dans ce processus auraient bénéficié grandement d'une meilleure connaissance de l'implication des SNAREs apicales dans notre modèle d'étude.

Plus précisément, il a été démontré dans différents systèmes que les syntaxines associées aux membranes plasmiques jouaient très probablement un rôle non seulement dans l'arrimage des compartiments sécrétoires à la membrane plasmique, mais aussi probablement dans leur fusion avec cette même membrane, et cela en association avec V0. Entre autres, disposer d'un mutant de syntaxine épithéliale nous aurait donc été d'un grand

Figure 51. PHYLOGENIE DES SYNTAXINES.



J'ai sélectionné les séquences protéiques des syntaxines trouvées dans les banques de données protéiques et aligné avec les syntaxines de *C. elegans* (en rouge). Cet arbre est le résultat d'un tri correspondant à la partie de l'arbre initial où se trouvent les syntaxines de *C. elegans* potentiellement associées à la membrane plasmique. J'ai utilisé comme groupe externe des protéines conservées de type syntaxine (syntaxin-like) mais qui s'en éloigne significativement.

secours pour réaliser des études d'épistasie et préciser à quelle étape de la sécrétion apicale VHA-5 et le secteur V0 sont requis, comme Hiesinger et coll. ont voulu le faire dans les neurones de Drosophile (Hiesinger, Fayyazuddin et al. 2005).

Cela a donc motivé une recherche des syntaxines de la membrane plasmique chez *C. elegans*. Dans un premier temps, j'ai donc réalisé un alignement multiple d'un maximum de séquences de syntaxines potentiellement associées aux membranes plasmiques disponibles dans les banques de données protéiques.

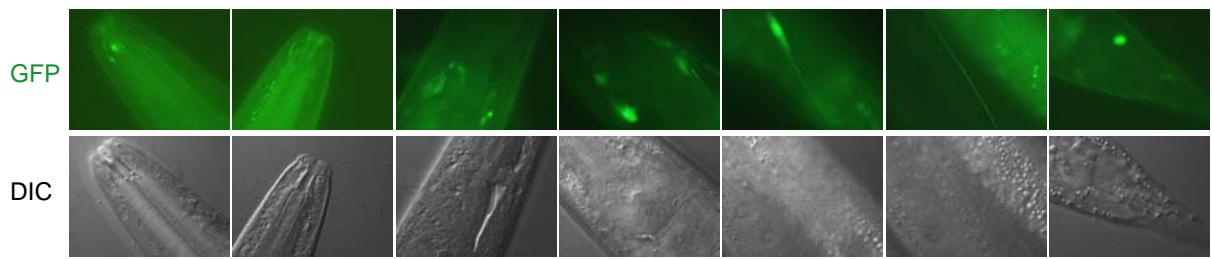
3.1.2 Les séquences protéiques des syntaxines associées à la membrane plasmique ségrégent ensemble.

La première observation que j'ai pu faire suite à cet alignement était que les syntaxines se regroupent davantage en fonction de leur localisation subcellulaire, que de leur appartenance à tel ou tel groupe d'organisme (Figure 51). Cela nous apporte deux informations intéressantes. Tout d'abord, les syntaxines qui ont des fonctions similaires dans différents organismes dérivent probablement d'un même ancêtre et ont conservé suffisamment de points communs pour qu'on puisse éventuellement tester leur capacité à se complémenter, et pour qu'on ait peu de chance de se tromper sur le type de syntaxine qu'on étudie. Deuxièmement, si ces syntaxines ségrégent ainsi, c'est qu'elles doivent contenir des séquences peptidiques spécifiques d'un type d'organite ou d'un type de composition lipidique membranaire...

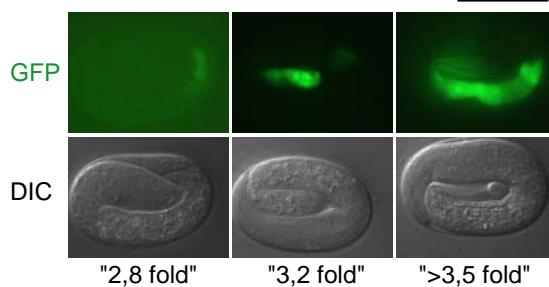
Cet alignement m'a donné pour *C. elegans* 4 syntaxines potentiellement associées à la membrane plasmique : UNC-64 (locus *F56A8.7*, déjà bien décrite et spécifique des neurones (Hosono and Kamiya 1991; Ogawa, Harada et al. 1998; Saifee, Wei et al. 1998)) SYN-1 (locus *F35C8.4*, non étudiée), SYN-2 (locus *F48F7.2*, non étudiée), et SYN-4 (locus *T01B11.3*, déjà étudiée mais pas pour ses éventuels rôles après les premières divisions embryonnaires (Jantsch-Plunger and Glotzer 1999)). En revanche, parmi celles-ci et en dehors des informations disponibles sur *unc-64*, rien ne permettait, sur la base de la similitude des séquences protéiques, de déterminer laquelle (lesquelles) étais(en)t épithéliale(s). La seule syntaxine que je pouvais écarter était *unc-64* pour laquelle les mutants nuls et les données d'expression existantes montrent qu'elle n'est pas requise dans les *epithelia* du ver (Saifee, Wei et al. 1998). J'ai d'ailleurs vérifié que les mutants *unc-64* ne présentaient pas de défauts d'alae.

Figure 52. EXPRESSION ET LOCALISATION DE LA PROTEINE DE FUSION SYN-1::GFP.

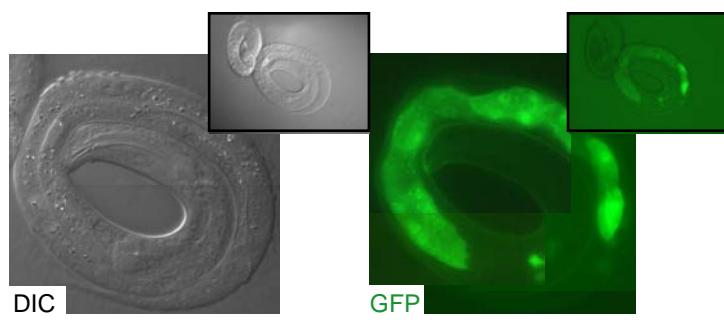
A Expression neuronale de SYN-1::GFP chez l'adulte.



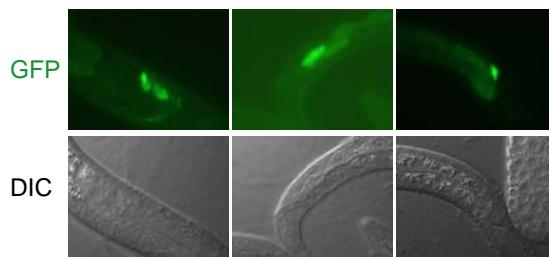
B Expression intestinale de SYN-1::GFP chez l'embryon.



C Expression intestinale de SYN-1::GFP chez la larve L1.



D Expression pharyngéale, intestinale et neuronale de SYN-1::GFP chez la larve L2.



LEGENDE.

A,B,C,D : Expression de la fusion traductionnelle *syn-1::gfp* injectée à 15 ng/µL avec le marqueur *rol-6* à 100 ng/µL, dans des individus sauvages Bristol N2 (barres 20 µm).

3.1.3 Les syntaxines étudiées présentent une spécificité d'expression tissulaire.

Pour déterminer quelle(s) syntaxine(s) pouvaient être épithéliale(s), j'ai généré par PCR des fusions GFP traductionnelles (Cassata, Kagoshima et al. 1998), que j'ai ensuite injectées dans des vers de type sauvage. J'ai réalisé cela pour les deux gènes qui n'avaient pas été étudiés : *syn-1* et *syn-2*. Pour *syn-1*, j'ai choisi la région intergénique précédant l'ORF (« Open Reading Frame ») et le dernier intron du gène précédent comme promoteur (amplification entre les oligonucléotides : 5'-CCAATTCACTTCCACGGAAAGG-3' et 5'-GAAAAGTTCTTCCTT TACTACAAATAGGAGTAAAGTGGCAAACG-3'). Pour *syn-2*, j'ai pris également la région intergénique comme promoteur (amplification entre 5'-TTGTCCAAATGCACTGCTGTCG-3' et 5'-GAAAAAGTTCTCCTTACTCTGTTATTG TTATTGCCTCTTGAT-3'). Ces choix ont été guidés en partie par le niveau de conservation de ces régions intergéniques chez *C. briggsae*. J'ai également cloné la séquence promotrice de 5 kb de *syn-2* dans le vecteur pPD95.69 codant une GFP à signal de localisation nucléaire (NLS) pour disposer d'un rapporteur transcriptionnel de *syn-2*.

3.1.3.1 Rapporteurs traductionnels.

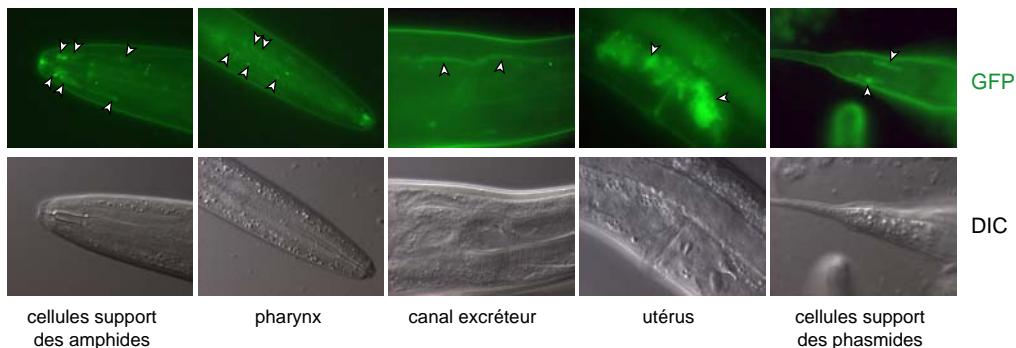
Les rapporteurs traductionnels GFP injectés à 15-20 ng/µL avec le marqueur phénotypique *rol-6* à 100 ng/µL, ont révélé que *syn-1* est surtout exprimé dans différents neurones (cordes ventrale et dorsale et neurones de la tête) à partir du stade L2 et essentiellement chez l'adulte, tandis qu'il est exprimé dans l'intestin du stade « 2,8 fold » au stade L2 (Figure 52). En revanche, *SYN-2 ::GFP* s'est révélé être exprimé dans les cellules supports des organes chimiosensoriels, le rectum, la vulve, l'utérus, le canal excréteur (Figure 53A et 53B). Je n'ai donc observé d'expression épidermique pour aucun des rapporteurs testés.

3.1.3.2 Rapporteur *Psyn-2 ::nls ::gfp*.

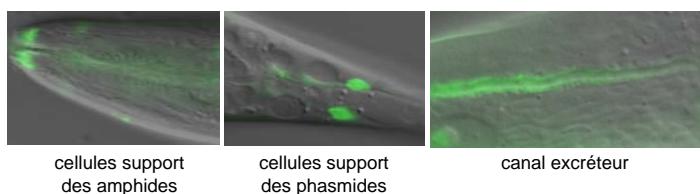
Comme aucune des deux syntaxines ne semblait exprimée dans l'épiderme, qu'il est fréquent que l'expression protéique dans ce tissu soit difficile à détecter, et que *syn-2* est exprimée dans les autres tissus épithéliaux d'intérêt, j'ai souhaité vérifier que je n'avais rien manqué de son patron d'expression. J'ai utilisé le rapporteur transcriptionnel *Psyn-2 ::nls ::gfp* que j'avais construit, que j'ai injecté à 5 ng/µL avec *rol-6* à 100 ng/µL dans la souche sauvage Bristol N2. J'ai ainsi détecté une expression forte dans les cellules sheath et

Figure 53. EXPRESSION ET LOCALISATION DES FUSIONS SYN-2::GFP ET Psyn2::GFP.

A Localisation épithéliale de SYN-2::GFP chez l'adulte.



B Superpositions DIC / GFP



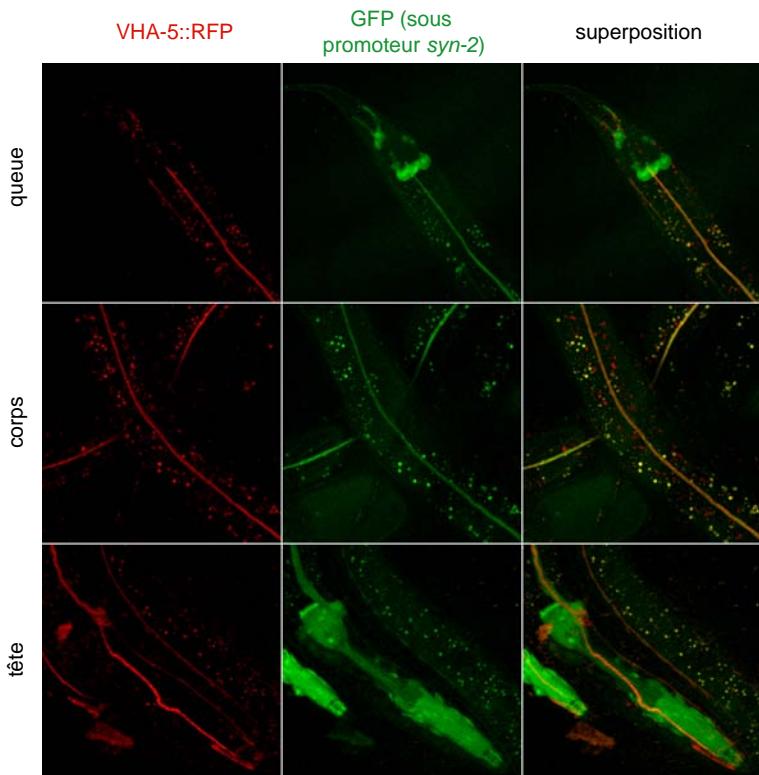
LEGENDE.

A : La fusion traductionnelle *syn-2::gfp* est exprimée dans les cellules support des amphides (panneau de gauche) et des phasmides (panneau de droite) où elle se localise à la membrane apicale. Il en est de même pour le canal excréteur (panneau central) et l'utérus (deuxième panneau en partant de la droite). Par ailleurs la fusion GFP se localise dans des compartiments formant des points dans les cellules du pharynx (2ème panneau à gauche).

B : Confirmation de la localisation apicale de SYN-2::GFP dans les cellules supports des amphides (gauche), phasmides (centre) et dans le canal excréteur (droite), par superposition des images obtenues en contraste interférentiel (DIC) et fluorescence (GFP).

C : Confirmation des tissus où s'exprime le promoteur endogène *Psyn-2* utilisé pour faire la fusion traductionnelle *syn-2::gfp*, par la localisation du rapporteur transcriptionnel *Psyn-2::nls:gfp*. Une expression forte est détectée dans les cellules supports des organes chimiosensoriels, le pharynx, le rectum et le canal excréteur. L'expression de *vha-5::rfp* permet de situer le canal excréteur et les domaines apicaux des cellules supports des organes chimiosensoriels.

C Expression de *Psyn-2::nls:gfp* au stade L4.



socket des amphides et phasmides, dans le canal excréteur, dans le rectum, et dans le pharynx où la plupart des cellules hors cellules neuronales sont marquées (Figure 53C). Je n'ai observé aucune expression dans l'épiderme, indiquant que soit ce gène n'y est pas exprimé, soit que la région promotrice choisie (5 kb) est insuffisante (il est également possible que certaines séquences régulatrices se trouvent dans des introns ou exons).

3.1.4 Obtention du mutant *syn-2(mc45)*.

3.1.4.1 Pourquoi choisir le gène *syn-2* ?

Etant donné que le rapporteur traductionnel *syn-2 ::gfp* révélait une expression dans les cellules support des amphides et phasmides, dans la vulve, le rectum, l'utérus et la cellule excrétrice, il nous a semblé intéressant d'essayer d'obtenir un mutant nul de ce gène.

L'absence d'expression décelable dans l'épiderme à ce stade pouvait être due soit au fait qu'effectivement cette syntaxine n'y est pas exprimée, soit qu'elle y est exprimée en quantités difficiles à déceler, soit que des régions régulatrices manquaient dans la construction que j'ai faite. En tout état de cause, les autres tissus d'intérêt exprimant la syntaxine 2, nous étions intéressé par l'obtention d'un mutant.

3.1.4.2 Stratégie de mutagenèse.

Souhaitant un mutant nul, nous avons voulu favoriser l'obtention de délétions. Nous avons donc choisi comme mutagène l'intercalant TriMéthylPsoralène (TMP) en combinaison avec une irradiation aux UV. Chez *C. elegans*, cet agent mutagène a un taux de mutation pour un grand gène comme *unc-22* (~36 kb) de 1×10^{-3} , dont environ 30% de délétions de 0,3 à 1 kb décelables par PCR (Gengyo-Ando and Mitani 2000). Pour un gène comme *syn-2*, de 2734 bases, le taux de mutation impliquant une délétion décelable par PCR serait de $2,6 \times 10^{-5}$.

Souhaitant obtenir un certains nombre d'autres mutants pour d'autres membres de l'équipe, nous avons réalisé une mutagenèse sur un millier d'animaux synchronisés au stade jeune adulte, puis réparti 25 individus F1 sur 4000 boîtes, ce qui représentait 10^5 individus diploïdes donc 2×10^5 génotypes haploïdes. Comme nous avons choisi de cibler des délétions dans des fenêtres de 3 kb en moyenne (cf. point suivant), le taux de mutagenèse attendu pour chaque gène ciblé était de près de 3×10^{-5} , ce qui nous faisait espérer ~5 délétions par gène d'intérêt sur l'ensemble des individus ciblés.

3.1.4.3 Stratégie de criblage)

Comme ce qui nous intéressait était d'obtenir des mutants dont nous ne connaissions a priori pas le phénotype, nous avons choisi de cribler les mutations par PCR, d'où l'importance de favoriser les délétions par rapport aux mutations ponctuelles, en plus du fait que nous souhaitions obtenir des mutants nuls.

3.1.4.3.1 Principe.

Le principe de ce criblage par PCR est de cribler les mutants en criblant leur ADN et non leur phénotype. Il s'agit de laisser les animaux pondre sur leurs boîtes, de prélever une partie de la descendance pour effectuer des lysats, dont l'ADN va servir de matrice pour les PCRs. Une banque de lysats est ainsi générée en même temps qu'une banque d'animaux.

On utilise alors des oligonucléotides choisis pour amplifier une région de 2 kb à 3,5 kb (maximum, pour l'allèle sauvage) dans le gène d'intérêt. On fait les PCR sur les lysats et on dépose sur gel d'agarose (+Bromure d'Ethidium) les amplifiats.

3.1.4.3.2 Réalisation.

Chaque lysat correspond à la descendance de 25 à 50 individus dont 1 seul est potentiellement muté pour le gène d'intérêt. De plus on cible sur des « pools » de lysats (Annexe 19), augmentant ainsi la dilution, ce qui diminue la détectabilité des allèles mutés pour le gène d'intérêt par rapport aux allèles sauvages.

Pour augmenter la détectabilité des mutations nous avons donc utilisé un protocole de criblage par PCR en deux étapes, entre lesquelles les amplifiats sont digérés par une enzyme de restriction thermostable coupant uniquement dans l'allèle sauvage (Wei, Yuan et al. 2002) (Annexe 20). La contrainte majeure que ce type d'approche implique, c'est qu'il faut choisir une région du gène d'intérêt où l'on trouve un site de restriction pour l'enzyme choisie (ici PspGI). J'ai décrit les différentes étapes de « pooling » et du criblage par PCR dans les Annexes 19 et 20.

3.1.4.4 Résultat : obtention de la délétion *mc45* (Figure 54).

En un peu moins d'un mois de crible, j'ai pu isoler et cartographier par séquençage de l'ADN mutant une délétion de 534 paires de bases dans le gène *syn-2*, qui provoque un décalage du cadre de lecture donnant lieu à un produit d'expression putatif de 70 acides aminés au lieu de 309, dépourvu du domaine C-terminal transmembranaire essentiel à la fonction des syntaxines dans les complexes SNAREs. *syn-2* (*F48F7.2*) est un gène dont le locus se situe sur le chromosome X, et donc présent en une seule copie chez le mâle. J'ai recroisé (« outcross ») 8 fois le mutant obtenu en répétant 4 fois la séquence de croisements

Figure 54. OBTENTION ET SEQUENCAGE DE LA DELETION MC45 DE SYN-2

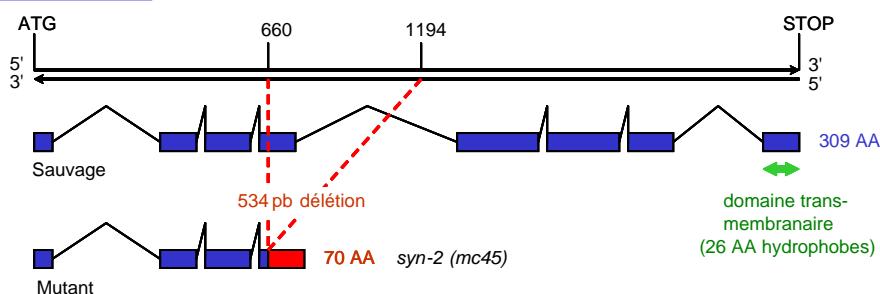
A

mutagenèse aléatoire au TMP/UV → Cible PCR pour des délétions → Confirmation des délétions → Extrait d'ADN génomique mutant → Séquençage et cartographie de la délétion.

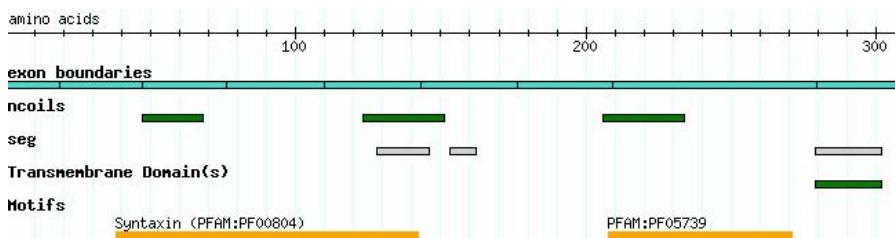


B

F48F7.2 = syn-2



C



LEGENDE.

A : Séquence des évènements de la mutagenèse à l'identification de la délétion.

B : Représentation des produits d'expressions prévus du gène *syn-2* et de la délétion *mc45*.

C : Représentation des domaines protéiques de SYN-2. *mc45* n'affecte pas le domaine syntaxine, mais enlève le domaine transmembranaire. La protéine résultante doit être cytoplasmique au lieu d'être transmembranaire.

suivante : croiser des hermaphrodites *mc45* par des mâles N2, puis des mâles *mc45* obtenus par des hermaphrodites N2, et réisoler des homozygotes *mc45* pour les recroiser à nouveau. J'ai ainsi obtenu la souche ML900 (*syn-2(mc45)*).

3.1.4.5 Caractérisation du mutant *syn-2(mc45)*.

3.1.4.5.1 Phénotypes d'arrêt et de létalité.

Après croisements, aucun phénotype n'est visible à l'état hétérozygote, rendant peut probable un effet dominant négatif du produit d'expression tronqué. L'homozygote hermaphrodite et le mâle mutants sont viables et peuvent être maintenus à 15°C, 20°C ou 25°C pourvu qu'on dispose d'un nombre suffisant d'individus au départ (un animal ne pond pas assez d'œufs pour assurer sa descendance à coup sûr). Le mâle mutant peut croiser avec une très bonne efficacité (ME=3, pour « Mating Efficiency », 3 est le maximum).

Sur 853 animaux analysés, la souche homozygote *mc45* présente une létalité embryonnaire de 3%. 4% des vers atteignent sans encombre le stade adulte et ne présentent pas de défauts évidents, mais 93% des individus présentent un développement retardé. Parmi les phénotypes observés, on note 5% de vers retardés ou Sma (« small ») entre les stades L4 et adulte, 11% sont très retardés entre les stades L2 et L4 mais atteindront l'âge adulte et pondront des œufs au bout de 5-6 jours, 1% atteindront le stade adulte avec de nombreux défauts et mourront au début de ce stade sans pratiquement pondre ou bien des œufs morts, 44% s'arrêtent au stade L2 et vivront maladivement 10 à 20 jours, 13% s'arrêtent au stade L2 et mourront au bout de 3 jours, et enfin, 19% s'arrêtent au stade L2 et meurent rapidement après.

Le phénotype le plus marquant est un arrêt au stade L2 pour les trois-quarts des individus dont la plupart (deux-tiers) peuvent rester 15 jours à ce stade avant de mourir. L'ensemble des phénotypes observés n'est pas sensible à la température entre 15°C et 25°C.

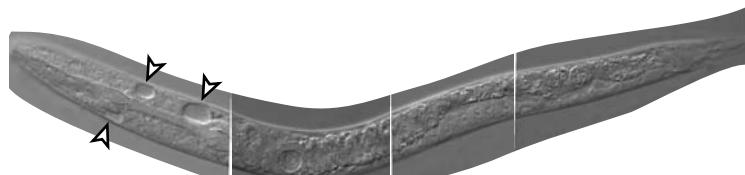
3.1.4.5.2 Phénotypes plus détaillés (Figure 55).

Chez les adultes.

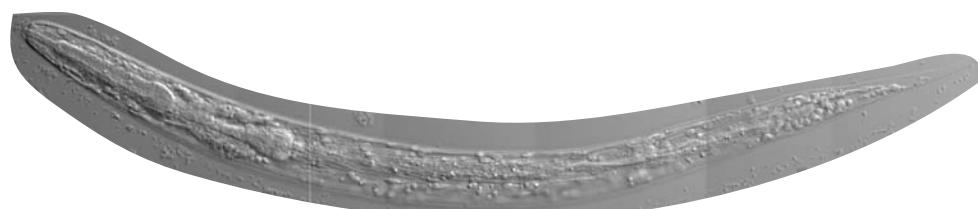
J'ai pu recenser différents défauts chez les adultes *mc45* (n=52). Tout d'abord, j'ai observé des vacuoles dans le pharynx (~30%), le rectum (83%), la vulve (83%), des cellules de la tête et de la queue (10%, probablement les cellules gaines des organes chimiosensoriels) et la cellule excrétrice. Chez tous les animaux j'ai remarqué des « bulles » de fluide dans le pseudocœlome. Ensuite, 65% des individus présentaient un lumen intestinal élargi et une constipation probablement due à un défaut du rectum, et environ 15%

Figure 55. PHENOTYPES DU MUTANT *SYN-2(MC45)*

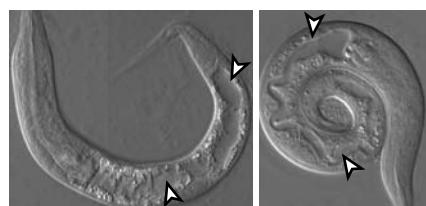
A1 Vacuoles au niveau des cellules supports des amphides au stade L3.



A2 Létalité Rod au stade L3.



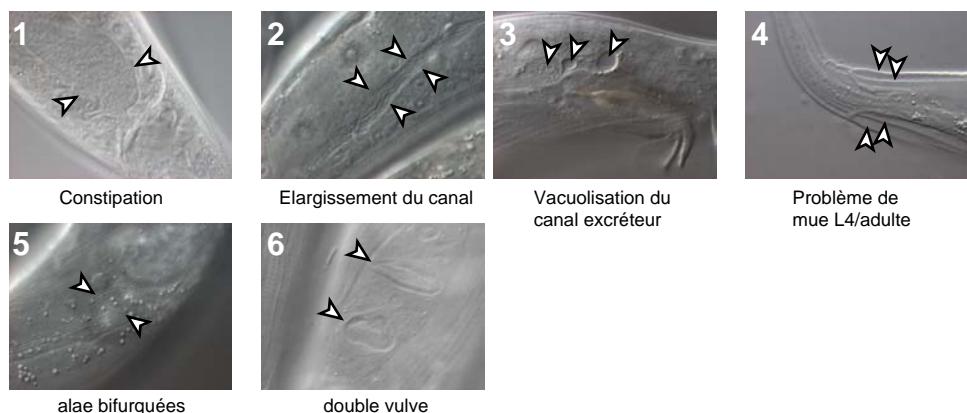
B Constipation dès le stade L1.



C Problème de mue L2/L3.



D Défauts chez l'adulte.



LEGENDE.

Images en microscopie à contraste interférentiel de vers *syn-2(mc45)*. Parmi les défauts observés chez ces animaux, on constate des problèmes de vacuoles dans les cellules supports dès le stade L3 (A1), une létalité Rod (A2), des défauts du canal excréteur chez l'adulte (D3), caractérisés par un élargissement du canal excréteur (D2). Un défaut net de constipation est également observé, probablement dû à un défaut de défécation (B et D1). Ensuite, des défauts de mues sont aussi visibles au stade L2/L3 (C) et L4/adulte où la vieille cuticule ne se détache pas partout (D4). Enfin, on peut observer ponctuellement des défauts d'alae qui sont bifurquées (D5). Très rarement (une observation) on peut voir aussi un phénotype de vulve multiple (Muv, D6).

des adultes étaient plus courts que les vers sauvages. Au niveau cuticulaire sur 98 animaux, 11% des vers présentaient des alae dont une rangée sur trois s'interrompait sur une portion du ver, 4% présentaient des alae qui n'avaient jamais les trois rangées attendues et étaient occasionnellement bifurquées, et 5% des animaux présentaient un défaut de détachement de la cuticule au niveau de la queue. Concernant les défauts des neurones chimiosensoriels ($n=20$), le marquage DiO est normal dans les phasmides et 2 ou 3 neurones ne sont pas marqués dans les amphides chez un tiers des animaux observés. La significativité de cette dernière observation est à vérifier sur un plus grand nombre d'individus, les vers sauvages présentant également des défauts de marquages occasionnels dans cette expérience. Enfin, j'ai observé un cas de vulve double sur 52 animaux.

Chez les larves.

Ce sont chez les larves qu'on trouve les individus les plus touchés puisqu'ils mourront avant le stade adulte. Notamment 78% des animaux sont vacuolisés au niveau de la tête ou de la queue, voir au niveau du pharynx à la fin du stade L2, dont quelques uns sont Rod ou Clr (environ 10%). Le phénotype de constipation était très pénétrant en fin L1 et fin L2 (de l'ordre de 85 à 90%), alors qu'il semblait transitoirement sauvé après la mue L1/L2 (65% d'animaux constipés au stade jeune L2). La plupart des animaux (entre 70% et 80%) au stade L2-L3 sont peu mobiles, courts, constipés, et vacuolisés. J'ai également observé des défauts de mue larvaire L2/L3 (environ 10%):

L'ensemble de ces phénotypes semble en concordance avec le patron d'expression, sauf pour les défauts de cuticule, et de mue qui évoquent des défauts de l'épiderme alors que celui-ci ne semble pas exprimer *syn-2*.

3.1.4.5.3 Sauvetages.

J'ai réalisé des sauvetages du mutant *mc45* par le cosmid F48F7 (injecté à 0,5 ng/ μ L avec le marqueur *rol-6*). Toutes les lignées obtenues observées présentaient a priori un sauvetage total des phénotypes adultes et de la létalité après le stade L2 (compte tenu du taux de transmission du cosmid). Je n'ai cependant pas compté précisément comme je l'ai fait pour l'analyse du mutant, et ne peux pas certifier que le sauvetage est de 100%.

J'ai également sauvé le mutant avec la fusion traductionnelle *syn-2 ::gfp* (injectée à 15 ng/ μ L), et pu constater que le sauvetage était très bon, et comparable à première vue à ce que j'avais observé avec le cosmid. Après comptages (Figure 56), j'observais une létalité embryonnaire de 2 à 3%, et que les phénotypes de l'adulte et de croissance ralentie étaient entièrement sauvés, à l'exception de certains animaux qui présentaient de temps en temps des vacuoles. Dans l'ensemble, 60 à 65% des animaux étaient entièrement sauvés, 5 à 10% d'adultes présentaient des défauts (vacuoles, constipation), et 27% des vers mourraient encore entre les stades L2 et L4. Une grande partie de cette létalité est probablement due à

Figure 56. QUANTIFICATIONS DU SAUVETAGE DE MC45 DANS DEUX LIGNEES SYN-2(MC45);EX[SYN-2::GFP]

syn-2(mc45) (pourcentage)

	17h	24h	48h	68h	5jrs
total	100%	100%	100%	100%	100%
en forme	96%	96%	9%	9%	20%
embryons morts	2%	2%	3%	3%	3%
larves mortes et mourantes	2%	2%	19%	32%	
défauts sévères divers			68%	56%	
adultes normaux			4%	7%	
adultes "Sma" ou "Gro"			6%	2%	20%

syn-2(mc45);Ex[syn-2::gfp] lignée 4, N=513

mc45 syn2GFP 4	24h	36h	48h	68h	5jrs
total	100%	100%	100%	100%	100%
en forme	93%	64%	63%	57%	69%
embryons morts	3%	3%	3%	3%	3%
larves mortes et mourantes	3%	13%	18%	27%	
défauts sévères divers			16%	14%	
adultes normaux			63%	57%	
adultes "Sma" ou "Gro"	0%	0%		69%	

syn-2(mc45);Ex[syn-2::gfp] lignée 3, N=736

mc45 syn2GFP 3	24h	36h	48h	68h	5jrs
total	100%	100%	100%	100%	100%
en forme	96%	70%	61%	59%	67%
embryons morts	2%	2%	2%	2%	2%
larves mortes et mourantes	2%	7%	18%	26%	
défauts sévères divers			19%	13%	
adultes normaux			61%	59%	
adultes "Sma" ou "Gro"	0%	0%		67%	

LEGENDE.

Comparaison de deux lignées transgéniques mc45;mcEx[syn-2::gfp ; rol-6] (injection de *syn-2::gfp* à 15 ng/µL) avec la souche homozygote *mc45*.

La létalité est de 80% pour *mc45*, et de 30% environ dans les lignées transgéniques qui transmettent le transgène à plus de 60%. La létalité larvaire précoce ne semble pas sauvée par le transgène tandis que les autres défauts le sont.

une absence du transgène ou a un mosaïcisme de son expression (ce ne sont pas des lignées stables). Néanmoins j'ai pu observer des embryons et des larves mortes exprimant le transgène, suggérant qu'une partie de cette létalité est également due à une toxicité relative de celui-ci.

Des défauts cuticulaires (cuticule double au niveau de la queue et alae aplatis ou avec une rangée manquante) étaient encore visibles mais je n'ai pas chiffré ces observations car elles ont été faites sur des adultes d'âges variés. Il faudrait que je refasse précautionneusement ces comptages en stendant précisément les vers.

3.1.4.6 Quelques idées d'expériences supplémentaires.

3.1.4.6.1 Eclaircir le paradoxe des défauts cuticulaires en l'absence d'expression épidermique.

Dans un premier temps, je comparerais attentivement les défauts cuticulaires observés ou non dans les vers sauvés par le cosmid, sauvés par la fusion traductionnelle et mutants non transgéniques. S'il s'avérait que le cosmid sauve les défauts cuticulaires mais pas le transgène GFP, je générerais de nouvelles constructions GFP en augmentant la taille des régions régulatrices choisies. Alternativement on pourrait envisager de faire produire un anticorps anti-SYN-2. En même temps, je pourrais faire exprimer *syn-2 ::gfp* ou son ADN complémentaire dans l'épiderme de *mc45* en dirigeant leur expression grâce au promoteur du collagène *dpy-7*, puis observer si les phénotypes cuticulaires sont sauvés.

3.1.4.6.2 Déterminer s'il y a un produit d'expression chez le mutant :

En l'absence de déficience dans la région d'intérêt, pour s'assurer que *mc45* est un mutant nul, il faudrait voir si le gène *syn-2* tronqué est exprimé (RT-PCR, Northern-Blot), et si un produit d'expression protéique est généré, ce qui demanderait de produire un anticorps contre le domaine N-terminal qui soit spécifique de cette syntaxine et de réaliser un Western-Blot.

3.1.4.6.3 Réaliser des expériences de sauvetage tissu-spécifique.

Le phénotype le plus frappant est ce défaut à partir de L2, qui mène soit à un arrêt en L2, soit à un développement très ralenti entre L2 et L4 et qui repart doucement pour permettre d'atteindre le stade adulte au bout de 5-6 jours de vie. Il serait intéressant de déterminer quel type cellulaire est responsable de la fonction manquante chez le mutant *mc45*. Comme la fusion GFP traductionnelle sous promoteur endogène est capable de sauver ce phénotype, il serait intéressant d'exprimer *syn-2 ::gfp* sous des promoteurs spécifiques :

- du pharynx (en utilisant le promoteur de *pha-4* par exemple),
- du canal excréteur (en utilisant le promoteur de *exc-2*),
- du rectum (grâce au promoteur de *egl-5*).

3.1.4.6.4 Etudier la spécificité fonctionnelle des syntaxines chez *C. elegans*.

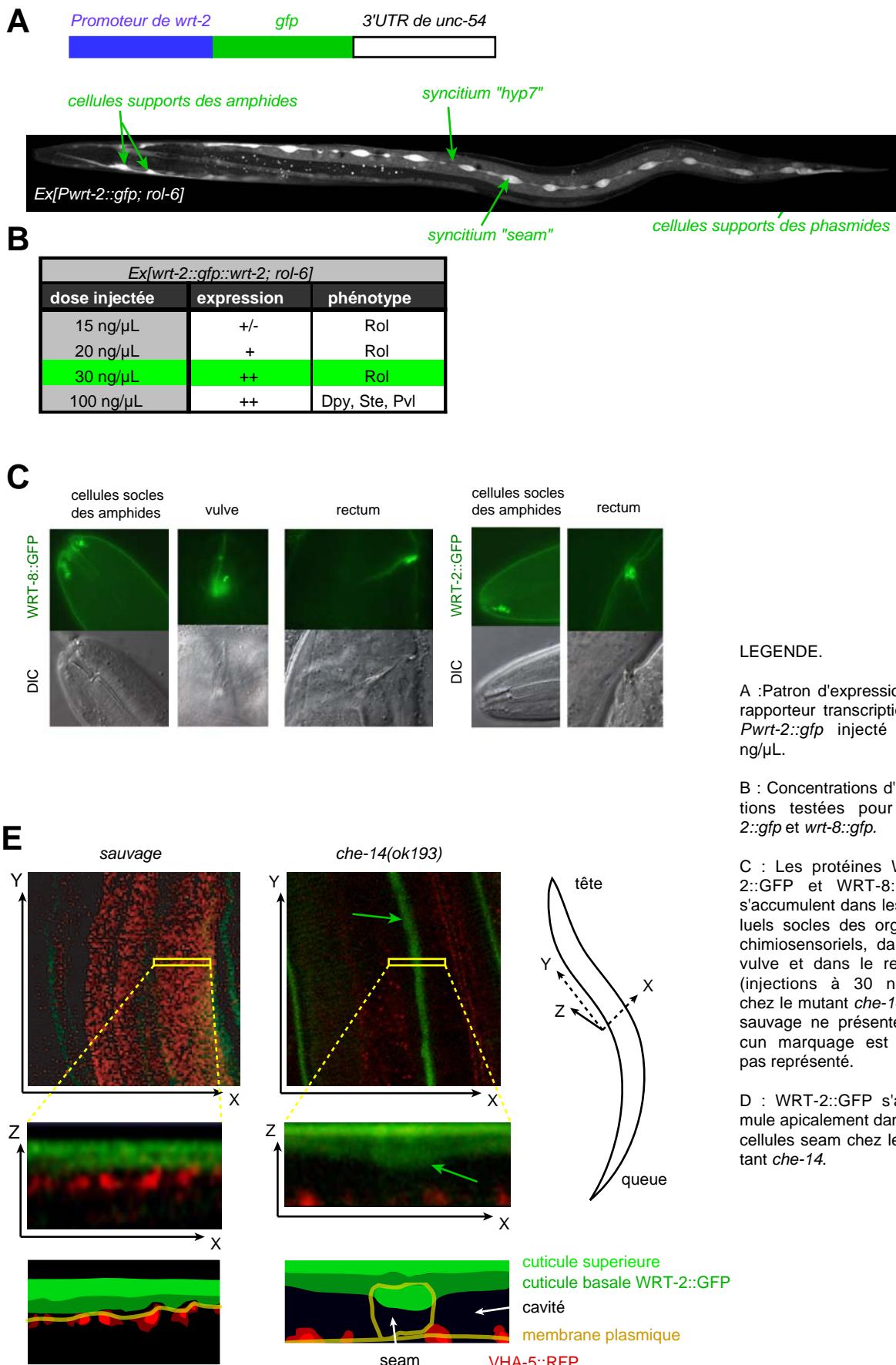
Ce à quoi je pense ici, consisterait à tenter de sauver le mutant *mc45* en remplaçant différents domaines de *SYN-2* par leur équivalent dans *SYN-1*, -3, -4 et *UNC-64* qui sont les plus proches de *SYN-2* au niveau phylogénétique et correspondent vraisemblablement à des syntaxines de la membrane plasmique. La question à laquelle je souhaiterais répondre serait ainsi : est-ce que la diversité des syntaxines chez *C. elegans* s'explique par des spécificités fonctionnelles (et si oui attribuées à quel domaine ?), ou bien cette diversité n'est elle que le résultat d'une spécificité tissulaire d'expression ?

3.1.4.6.5 Utiliser une syntaxine pour déterminer à quelle étape VHA-5 agit.

C'était l'idée de départ de cette recherche des syntaxines apicales : les complexes SNAREs étant décrits comme nécessaires à la fusion membranaire, savoir si *vha-5* est épistatique ou non à la syntaxine épidermique apicale permettrait de positionner V0 dans le processus de fusion. *SYN-2* ne permettant pas a priori d'étudier la relation entre VHA-5 et les SNAREs dans l'épiderme *hyp7* où elle ne semble pas exprimée. La syntaxine 4 est également exprimée chez les larves et correspond peut-être à la syntaxine requise dans les cellules épidermiques. Son implication dans la cytokinèse, n'a pas permis d'évaluer son rôle après les premières divisions cellulaires (Jantsch-Plunger and Glotzer 1999). Il serait donc intéressant de générer des rapporteurs GFP (transcriptionnel et traductionnel) pour déterminer l'expression de *SYN-4* chez l'adulte, et de réaliser des expériences d'ARNi contre *syn-4* à partir du stade L1 ou L2 pour regarder si les alae sont affectées chez l'adulte.

Plutôt que d'utiliser des mutants ou des ARNi pour l'étude d'épistasie entre *vha-5* et le gène codant la syntaxine de la membrane plasmique apicale de l'épiderme, on pourrait utiliser la surexpression épidermique des syntaxines 2 et 4 sous contrôle du promoteur du collagène *dpy7*, à l'instar de ce qui a été fait chez la drosophile (Hiesinger, Fayyazuddin et al. 2005). Si la surexpression induit des défauts cuticulaires ou épidermiques chez les sauvages, il s'agirait ensuite de tester l'influence des mutations de *vha-5* sur ce phénotype.

Figure 57. EXPRESSION ET LOCALISATION DE WRT-2



3.2 Un lien probable avec la réponse immunitaire innée chez *C. elegans*...

3.2.1 Point de départ.

Dans un crible pour des gènes surexprimés et sous-exprimés en réponse à l'infection de *C. elegans* par *Serratia marcescens* (bactérie pathogène responsable d'infections nosocomiales), l'équipe de Jonathan Ewbank à Luminy, a identifié un gène surexprimé codant une protéine de la famille Hedgehog (HRP pour « Hedgehog-Related Protein ») : *grd-3* (données confidentielles) (Mallo, Kurz et al. 2002). Cette observation ouvrait la possibilité que les protéines de type Hedgehog soient impliqués dans la réponse immunitaire innée, en tant que peptides antimicrobiens par exemple. Si tel était vraiment le cas, les mutants affectant la sécrétion des HRPs devraient être plus sensibles aux infections. D'autre part la voie de sécrétion que nous avions identifiée, impliquant le secteur V0 de la V-ATPase et des exosomes contenant des HRPs, rappelle fortement ce qui est connu pour la lignée hématopoïétique avec la sécrétion d'exosomes par des lysosomes sécrétoires (cf. 2.3.3).

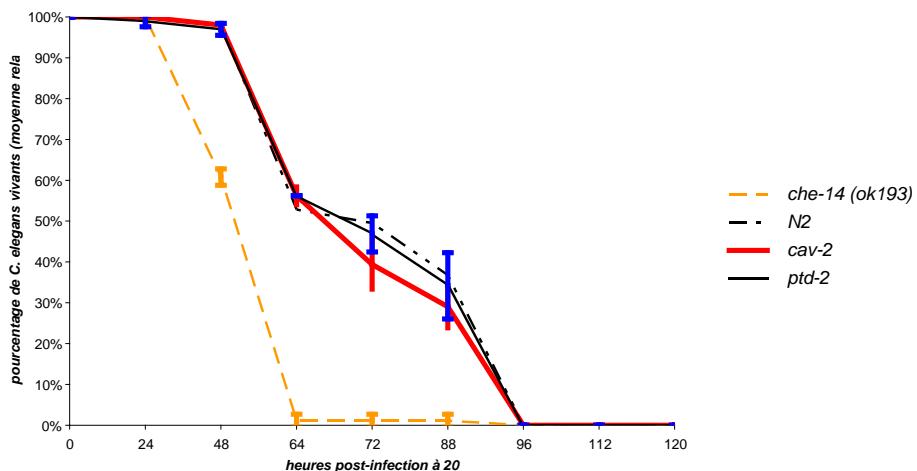
Par ailleurs, toujours au laboratoire de J. Ewbank, en utilisant un modèle d'infection du nématode par un champignon nématophage (*Drechmeria coniospora*) en parallèle du modèle d'infection par *S. marcescens*, il a été mis en évidence une réponse immunitaire de type inné, et différents gènes impliqués dans cette réponse ont été identifiés (Couillaud, Pujol et al. 2004). En collaboration avec le laboratoire de J. Ewbank, nous avons décidé d'étudier l'implication potentielle de la voie de sécrétion que Samuel et moi avons mise à jour, dans le contexte de l'infection par *D. coniospora*.

3.2.2 Les mutants che-14(ok193) sont hypersensibles à l'infection par *Drechmeria coniospora*.

J'ai observé que dans les mutants che-14, les HRPs WRT-2 et WRT-8 s'accumulaient dans les cellules socles des organes chimiosensoriels et apicalement ans les seam (Figure 57).

Partant du principe que les HRPs pouvaient constituer des peptides antimicrobiens, et que CHE-14 jouait probablement un rôle dans leur transport, ou dans leur présentation à la membrane apicale ou dans les exosomes sécrétés par l'épiderme, j'ai soumis les mutants

Figure 58. EXPERIENCE D'INFECTION PAR *D. CONIOSPORA* SUR DIFFERENTS MUTANTS.



LEGENDE.

Expérience d'infection par *D. coniospora* de *che-14*, *ptd-2*, *cav-2* et *N2*.
Seuls les mutants *che-14* (en rouge) présentent une sensibilité accrue à l'infection et meurent significativement plus tôt que les autres mutants et que les vers sauvages *N2*. *ptd-2* code pour un orthologue de CHE-14/Dispatched mais serait un pseudogène. *cav-2* est un mutant de la cavéoline 2.

che-14(ok193) à l'infection par *D. coniospora*. L'expérience a été répétée trois fois. Il est apparu que les mutants *che-14* étaient plus sensibles à l'infection, compte tenu de la létalité induite par le défaut d'osmorégulation, bien sûr (Figure 58). Pour ne pas compter des animaux tués par leur défaut d'osmorégulation, je n'ai tenu compte que des animaux ne présentant pas du tout de défaut d'osmorégulation avant leur immobilisation par le champignon et tout animal pour lequel un doute subsistait était écarté de l'analyse. Idéalement il faudrait que je refasse une infection avec davantage de points de contrôle.

3.2.3 Les mutants hypomorphes de sécrétion de *vha-5* sont aussi hypersensibles à l'infection par *D. coniospora*.

Si *che-14*, dont la protéine manquante est impliquée dans la sécrétion des HRPs, présente une hypersensibilité à l'infection par *D. coniospora*, étant donné que VHA-5 est également requis pour la sécrétion des HRPs (cf. partie II Article 2), on pouvait s'attendre à ce que les mutants hypomorphes de sécrétion de *vha-5*, présentent aussi une sensibilité accrue à l'infection par ce champignon. De plus VHA-5 est impliqué dans une voie de sécrétion d'exosomes, structures typiques de la lignée hématopoïétique des vertébrés dont les cellules du système immunitaire.

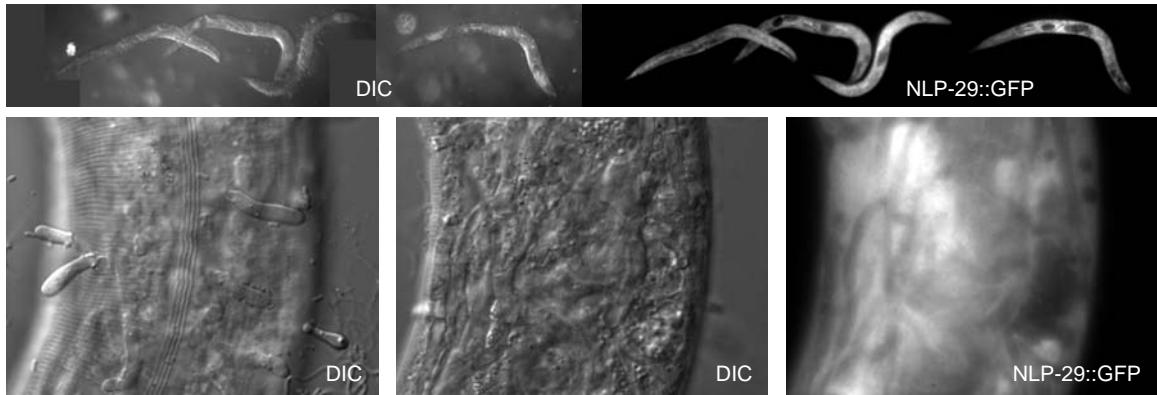
J'ai donc soumis à l'infection par *D. coniospora* les mutants « cuticule » de *vha-5* (L786S, E830Q et V844F) à plusieurs reprises. Dans tous les cas, il s'est avéré que ceux-ci étaient effectivement plus sensibles à l'infection, d'un point de vue qualitatif (la progression du champignon est plus rapide, Figure 59), et quantitatif (la survie est moins bonne, Figure 60).

De façon très intéressante, les mutants « canal » (W190A en particulier) présentent une meilleure survie que les animaux sauvés par la construction sauvage *vha-5::gfp* (pML670). On pourrait peut-être attribuer cela au fait que les champignons qui infectent les nématodes sécrètent des enzymes (Huang, Zhao et al. 2004) requérant peut-être un pH cuticulaire bas pour dégrader efficacement la cuticule. Selon cette hypothèse, dans le cas des mutants « canal », du fait d'un défaut de pH cuticulaire, la dégradation serait plus lente, et le développement de l'infection serait ralenti.

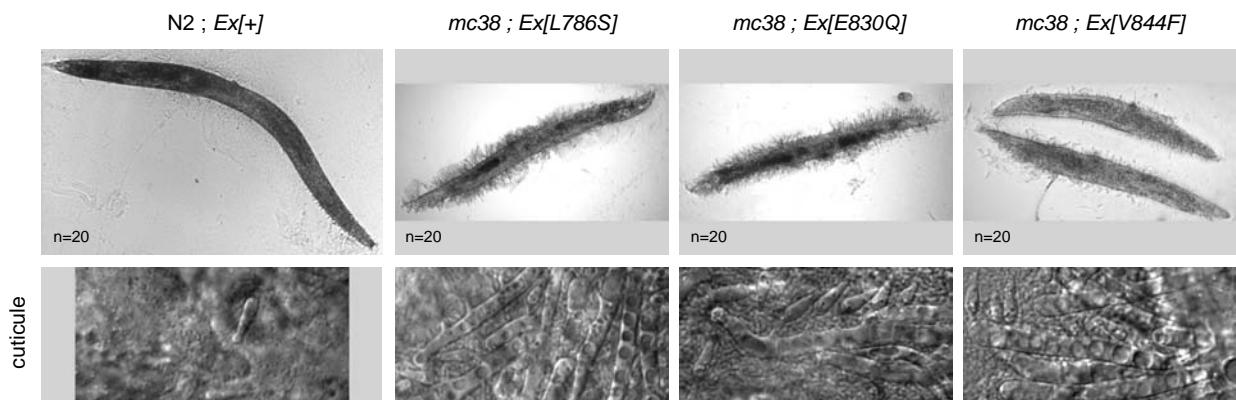
Ces résultats montrent qu'au moins un lien indirect existe entre la voie de sécrétion impliquant les CMVs et les exosomes, et l'immunité innée chez *Caenorhabditis elegans*.

Figure 59. INFECTIONS PAR *DRECHMERIA CONIOSPORA*.

A Infection de vers sauvages N2 par *Drechmeria coniospora* à 24h à 25°C.



B Infections des "mutants cuticule" de *vha-5* par *Drechmeria coniospora* à 68h à 20°C.



LEGENDE.

A : L'infection par *D. coniospora* induit l'expression du transgène *nlp-29::gfp* de façon maximale 24h après la mise en présence des spores avec des animaux N2 transgéniques pour le transgène intégré Is7 (*nlp-29::gfp*). A ce stade le champignon n'a pas encore sporulé (cf. photo de la cuticule en bas à gauche).

B : Les mutants de sécrétion hypomorphes de *vha-5* portant les mutations L786S, E830Q, et V844F, sont plus sensibles à l'infection que les vers sauvages. Le développement du champignon est plus rapide dans ces vers que dans les sauvages : le champignon a à peine percé la cuticule chez les N2 (en bas à gauche) quand chez les "mutants cuticule" de *vha-5*, il a déjà sporulé (observer les spores en forme de poires dans les images du bas).

3.2.4 Quelques perspectives.

3.2.4.1 Pourquoi les mutants « cuticule » seraient plus sensibles ?

Différentes possibilités expliqueraient la sensibilité des mutants « cuticule » à l'infection.

Tout d'abord, la cuticule anormale favoriserait structurellement la pénétration du champignon. Alternativement, ce serait la protection chimique de la cuticule qui serait amoindrie chez ces mutants du fait de peptides antimicrobiens « résidents » (pour les opposer à des peptides induits par l'infection) qui ne seraient pas sécrétés correctement.

Deuxième catégorie d'explication, les mutants auraient une réactivité limitée à l'infection, du fait d'un défaut de récepteurs apicaux nécessaires à la transduction du signal de stress. Ces récepteurs transportés par les CMVs ne seraient pas présents en quantité suffisante à la membrane plasmique pour induire une réponse immunitaire efficace.

Troisièmement, en imaginant que la réponse immunitaire soit correctement déclenchée, l'invalidation de la voie de sécrétion des CMVs affecterait la sécrétion des peptides antimicrobiens, dont la concentration serait alors insuffisante pour contenir l'infection.

3.2.4.2 Quelques suggestions.

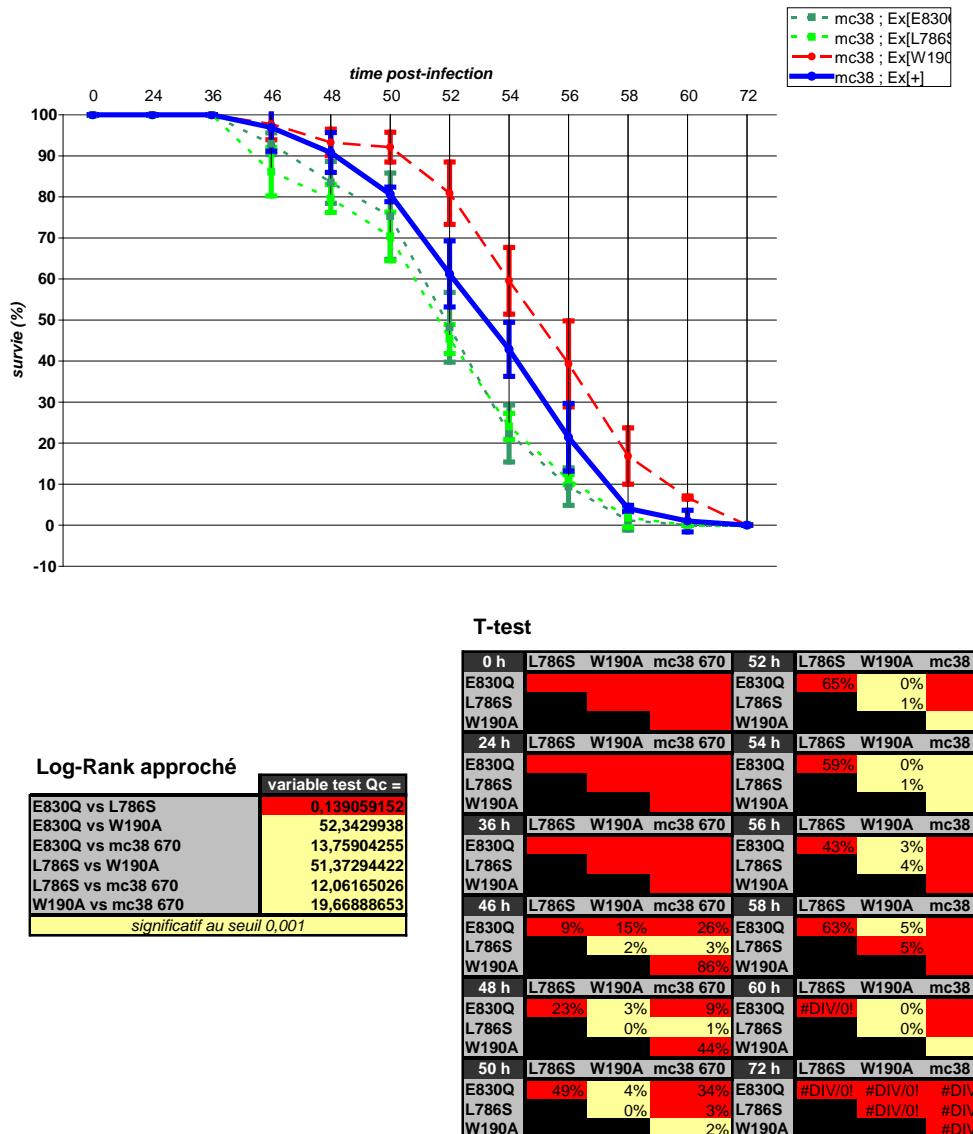
Pour discriminer les trois catégories de défauts potentiels que j'ai évoqués ci-dessus, plusieurs approches peuvent-être tentées.

Pour tester l'importance de la nature de la cuticule dans la progression de l'infection, il faudrait réaliser des cinétiques d'infection en parallèle pour des vers mutants ou soumis à l'ARNi contre différents constituants de la cuticule : collagènes, cuticulines, HRPs cuticulaires (QUA-1 par exemple), enzymes de la voie de biosynthèse de ces protéines, etc.

Pour évaluer la réactivité des vers à l'infection, il faudrait pouvoir corrélérer le développement du champignon et la réponse du ver. Une possibilité serait d'utiliser les rapporteurs transcriptionnels de différents gènes induits lors de l'infection (Mallo, Kurz et al. 2002; Couillault, Pujol et al. 2004) et d'observer leur patron d'expression temporelle chez les mutants « cuticule » en comparaison avec les vers sauvages et les mutants « canal ». Si c'est la détection du parasite qui pose problème pour les mutants « cuticule », on devrait observer une absence d'induction ou un délai dans l'induction de l'expression des rapporteurs utilisés

Pour tester l'efficacité de la sécrétion des peptides antimicrobiens, il faudrait comparer les cinétiques d'expression et de sécrétion d'un peptide antimicrobien (en utilisant des

Figure 60. EXPERIENCE D'INFECTIONS PAR *DRECHMERIA CONIOSPORA* CHIFFREES CHEZ DIFFERENTS MUTANTS DE VHA-5



LEGENDE.

J'ai réalisé plusieurs fois des infections par *D. coniospora* sur les mutants hypomorphes "cuticule" et "canal" de *vha-5*. J'ai compté le nombre d'animaux survivants à des intervalles de 2 à 12h selon le moment de l'infection. De façon nette et systématique, en dehors des différences de progression du champignon (cf. figure précédente), on observe une survie moins importante des mutants "cuticule" par rapport aux mutants sauvés par la construction sauvage, et ces derniers survivent moins bien que les mutants "canal". Ces résultats sont significatifs, non seulement par un test du Log-Rank approché (en jaune significatif au seuil de 0,001, en rouge non significatif), mais aussi par un T-test point par point (qui est plus stricte).

animaux double-transgéniques pour le rapporteur transcriptionnel et le rapporteur traductionnel de ce peptide antimicrobien, par exemple NLP-29 (Couillault, Pujol et al. 2004)). On pourrait observer également si ce peptide sécrété s'accumule au niveau des CMVs chez les mutants « cuticule ». De plus, on pourrait tester si les HRPs WRT-2 et WRT-8 ont des propriétés antimicrobiennes, par exemple en les surexprimant chez des animaux sauvages pour voir si ces animaux résistent mieux à l'infection. Enfin, il faudrait également observer si l'activité sécrétoire des CMVs est augmentée en conditions d'infection chez un animal sauvage, ce qui supposerait de faire de la MET à différentes étapes de l'infection.

3.3 *Un cible ARNi ciblé pour rechercher de nouveaux acteurs de la voie de sécrétion identifiée.*

3.3.1 Définition du cible.

3.3.1.1 Objectif.

Le but de ce cible était d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la sécrétion apicale, mais aussi dans la réponse immunitaire innée, les candidats positifs étant testés en parallèle au laboratoire de Jonathan Ewbank dans différentes conditions d'infection.

De par les connaissances existantes dans d'autres modèles, les résultats que j'avais obtenus, le temps dont je disposais, et les hypothèses qui nous paraissaient raisonnables, nous avons décidé que je ciblerai un petit nombre de gènes (une cinquantaine) de différentes catégories, pour lesquels des mutants ou des clones bactériens ARNi sont disponibles.

3.3.1.2 Réalisation pratique.

La technique d'ARNi par « feeding » a été privilégiée parce que nous disposions de la banque complète de Julia Ahringer (Fraser, Kamath et al. 2000), que cette technique permet d'induire l'ARNi tardivement, qu'elle est rapide et peu coûteuse en temps. Deux choix pratiques importants ont été faits à ce niveau. Tout d'abord, l'ARNi a été réalisé sur des mutants *rrf-3*, qui sont sensibilisés à l'ARNi (RRF-3 est une ARN polymérase dépendante de l'ARN qui inhibe l'ARNi somatique). Deuxièmement, pour pouvoir observer l'effet de l'ARNi

au-delà des stades précoces pour les gènes requis chez l'embryon, j'ai soumis des larves L1 aux bactéries exprimant l'ARNi, et observé les adultes en résultant. Le critère d'observation choisi était l'aspect des alae adultes en DIC, et éventuellement celui des alae L1 dans la génération suivante. Les résultats ont été reproduits au moins deux fois. J'ai observé et photographié 30 individus de chaque type pour chaque expérience. Les observations ont été faites en aveugle en utilisant deux systèmes de codes successifs. Enfin, les clones bactériens utilisés ont été vérifiés en séquençant le plasmide qui exprime l'ARNi contre le gène testé.

3.3.1.3 Choix des candidats.

Les hypothèses générales qui ont sous-tendu nos choix étaient les suivantes. Tout d'abord, il est probable qu'il reste de nombreux gènes à identifier dans la voie de sécrétion par les CMVs. Ensuite, cette voie implique probablement des gènes déjà caractérisés ou impliqués dans la sécrétion chez d'autres organismes (Gruenberg and Stenmark 2004). Troisièmement, certains défauts des alae sont probablement spécifiques de cette voie, mais de façon générale, des anomalies développementales des cellules épidermiques (défauts de fusion des seam par exemple) (Shemer, Suissa et al. 2004) (Annexe 21), des défauts d'organisation du cytosquelette (d'actine par exemple), ou des défauts de la voie de sécrétion des collagènes peuvent également affecter la cuticule. Quatrièmement, l'épiderme du ver a un rôle notable dans la réponse immunitaire innée (Mallo, Kurz et al. 2002; Couillault, Pujol et al. 2004) et présente des caractéristiques de trafic intracellulaire (présence de CMVs sécrétoires) rappelant les cellules hématopoïétiques (Johnstone, Adam et al. 1987; Raposo, Nijman et al. 1996; Thery, Zitvogel et al. 2002). Cela laisse également penser que cette voie peut être régulée, notamment par le calcium (Savina, Furlan et al. 2003). Ensuite, comme le secteur V0 de la V-ATPase a un rôle majeur dans cette voie, des régulateurs de la V-ATPase sont probablement impliqués. Et enfin, il semble qu'il existe un rapport spécifique entre cette voie et la signalisation de type Hedgehog (lien avec *che-14* et Résultats de l'Article 2).

Nous avons choisi de confirmer des indications déjà publiées, pour servir également de contrôles positifs du cible (facteurs de transcription *nhr-* (Brooks, Appleford et al. 2003; Chen, Eastburn et al. 2004; Brozova, Simeckova et al. 2006), gènes *rap-* (Pellis-van Berkel, Verheijen et al. 2005), *sec-23* (Roberts, Clucas et al. 2003)), et de sélectionner quelques familles de protéines à tester. Parmi les potentiels régulateurs de la voie, j'ai ciblé des senseurs de calcium comme les synaptotagmines (Richmond and Broadie 2002; Koh and Bellen 2003; Andrews and Chakrabarti 2005) les calmodulines (Peters and Mayer 1998; Huber, Fialka et al. 2000; Quetglas, Iborra et al. 2002) et certains de leurs interacteurs, des

Figure 61. CRIBLE ARNi CIBLE SUR LE MUTANT *rrf-3*.

A

catégorie	nom du gène	"ORF"	souches mutantes	allèles	clone ARNi
facteurs de transcription	<i>nhr-23</i> <i>nhr-25</i> <i>nhr-41</i> <i>pxf-1</i>	<i>C01H6.5</i> <i>F11C1.6</i> <i>Y104H12A.1</i> <i>T14G10.2A</i>	RB657 non observé non observé RB1225	<i>ok407</i> non observé non observé <i>ok1186/+</i>	I-3F11 X-6I19 IV-1O20, IV-1B01 IV-5I14
GTPases Rap	<i>rap-1</i> <i>rap-2</i>	<i>C27B7.8</i> <i>C25D7.7</i>	TZ181 VC14	<i>pk2082</i> <i>gk11</i>	IV-4F17 -
étapes précoces de la sécrétion	<i>sec-23</i> <i>apr-3</i>	<i>Y113G7A.3</i> <i>F53H8.1</i>	IA260 non observé	<i>ij13/+</i> non observé	V-12J06 X-1O11
orthologues de la calmoduline	<i>cal-1</i> <i>cal-2</i> <i>cal-3</i> <i>cal-4</i> <i>cmd-1</i>	<i>C13C12.1</i> <i>C18E9.1</i> <i>M02B7.6</i> <i>T07G12.1</i> <i>T21H3.3</i>	- - - - -	- - - - -	V-8K02 II-6B01 IV-5F21 V-1J17
	<i>unc-73</i>	<i>F55C7.7</i>	non observé	non observé	I-1B16, 18, 20
protéines kinases C	<i>pkc-1</i> <i>pkc-2</i> <i>pkc-3</i> <i>kin-1</i>	<i>F57F5.5</i> <i>E01H11.1</i> <i>F09E5.1</i> <i>ZK909.2A</i>	RB781 VC127 VC277 VC307	<i>ok563</i> <i>ok328</i> <i>ok544/+</i> <i>ok338/+</i>	V-8G03 VC127 VC277 I-7K20
orthologues des synaptotagmines	<i>snt-1</i> <i>snt-2</i> <i>snt-3</i>	<i>F31E8.2</i> <i>F42G9.7</i> <i>Y75B7A.3</i>	DA596, MT6977, NM204	<i>ad596, n2665, ma290</i>	II-5A10 III-1A20
	<i>snt-4</i> <i>snt-5</i> <i>snt-6</i> "snt-7"	<i>T23H2.2</i> <i>R12A1.2</i> <i>C08G5.4</i> <i>F37A4.4</i>	RB737	<i>ok503</i>	I-3G17 V-1L19 II-1M16 III-3F07
candidats positifs pour l'infection (JE*)	<i>hcp-2</i> <i>cey-2</i> <i>prdx-6</i>	<i>T06E4.1</i> <i>F46F11.2</i> <i>Y38C1AA.1b</i>	RB988	<i>ok902</i>	V-6P23 I-2F21
voie Hedgehog	<i>hhat-1</i>	<i>ZC101.3</i>	-	-	-
	<i>hhat-2</i> <i>rib-1</i> <i>rib-2</i>	<i>Y57G11C.17</i> <i>F12F6.3</i> <i>K01G5.6</i>	VC302 VC733	<i>ok556/+</i> <i>gk318/+</i>	IV-7J15 IV-6K21 III-5B10
GTPases Rabs	<i>rab-4</i> <i>rab-5</i> <i>rab-7</i> <i>rab-11</i>	- <i>F26H9.6</i> <i>W03C9.3</i> <i>F53G12.1</i>	-	-	I-4J01 II-8G13 I-1A15
Exocyste	<i>sec6p</i> <i>sec-8</i> <i>sec-10</i> <i>sec15p</i>	<i>F09E5.5</i> <i>Y106G6H.7</i> <i>C33H5.9</i> <i>C28G1.3</i>	- - - -	-	II-4G20 I-5A08 IV-3N24 X-4B17
	<i>tag-333</i>	<i>C48G7.3</i>	VC1035, VC1025	<i>ok1511/+</i> , <i>gk431</i>	V-9N17
complexe PI3-Kinase	<i>vps-34/let-512</i> <i>bec-1</i>	<i>B0025.1</i> <i>T19E7.3</i>	KR1440 VC424, VC517	<i>h7974</i> <i>ok700/+</i> , <i>ok691/+</i>	I-2F20 IV-2N20
interacteurs calmoduline	<i>tag-255</i> <i>tag-119</i>	<i>C45G3.1</i> <i>K12C11.4</i>	VC761 VC432	<i>ok1208/+</i> <i>ok219</i>	I-4F17 I-1O17
ESCRT III	<i>tag-309</i>	<i>C56C10.3</i>	VC946	<i>ok1355/+</i>	V-5N17
GARP	<i>vps-54</i> <i>tag-197</i>	<i>T21C9.2</i> <i>F08C6.3</i>	VC985, VC986 VC625	<i>ok1463, ok1473</i> <i>ok853</i>	V-7G02 X-3N22
VPS classe C	<i>vps-11</i> <i>vps-16</i>	<i>R06F6.2</i> <i>C05D11.2</i>	RB1457 VC548	<i>ok1664</i> <i>ok719/+</i>	II-7B23 III-3K20
enzymes de maturation des collagénés	<i>cyn-9</i> <i>pdi-1</i>	<i>T27D1.1</i> <i>C14B1.1</i>	-	<i>tm466</i> <i>gk271</i>	III-1H12 III-1H16
phospholipase D	<i>pld-1 + C04G6.2</i>	<i>C04G6.2 + C04G6.3</i>	-	-	IV-5E16
cavéolines	<i>cav-1</i> <i>cav-2</i>	<i>T13F2.8</i> <i>C56A3.7</i>	VC205	<i>ok270</i> <i>tm394</i>	-
téraspanine	<i>tsp-15</i>	<i>F53B6.1</i>	SP2275, VC332	-	-
V-ATPase S1 / Ac45		<i>Y55H10A.1</i>	non observé	non observé	IV-1D10
dynamine	<i>dyn-1</i>	<i>C02C6.1</i>	CX51	<i>ky51</i>	X-7K09

B

Clones ARNi positifs.

LEGENDE.

clone ARNi	nom du gène	pénétrance	défauts d'alae adultes
I-3F11 X-6I19 IV1O20	<i>nhr-23</i> <i>nhr-25</i> <i>nhr-41</i>	~ ++ ++	interrompues irrégulières, plates irrégulières, interrompues
V-12J06 X-1O11	<i>sec-23</i> <i>apr-3</i>	~ +	absentes, interrompues interrompues
V-6P23	<i>hcp-2</i>	++	irrégulières, interrompues, bifurquées
IV-7J15 III-5B10	<i>hhat-2</i> <i>rib-2</i>	+++ ~	irrégulières, interrompues, bifurquées bifurquées pour la queue
II-4G20 I-5A08 IV-3N24 X-4B17	<i>sec6p related</i> <i>sec-8</i> <i>sec-10</i> <i>sec15p related</i>	+++ +++ +++ ~ / +	irrégulières, interrompues irrégulières, interrompues irrégulières, interrompues irrégulières et interrompues en L1
V-5N17 X-3N22 III-3K20 IV-7G02	<i>tag-309 + C37C3.3</i> <i>tag-197</i> <i>vps-16</i> <i>vps-54</i>	+++ + - -	interrupted, irregular iterompu, bifurquées pour la queue partiellement interrompues irrégulières, plates
V-1J17 III-1A20 I-1B18 I-1B20	<i>cmd-1</i> <i>snt-2</i> <i>unc-73</i> <i>unc-73</i>	+++ ~ / + - -	irrégulières, interrompues irrégulières, interrompues, plates irrégulières, interrompues, plates interrompues, plates
III-1H16	<i>pdi-1</i>	~	irrégulières, interrompues
IV-5E16	<i>pld-1 + C04G6.2</i>	+	irrégulières, interrompues, plates
IV-8L03 X-7K09	<i>plx-1</i> <i>dyn-1</i>	~ / + ~	irrégulières, interrompues, plates plates, écartées

A : Candidats testés. (-) signifie que ce n'est pas disponible et n'a pu être testé, "non observé" signifie que les souches mutantes existent mais n'ont pas été observées. En gris foncé sont indiqués les candidats qui n'ont pas pu être testés du tout.

B : Clones ARNi ayant induit des défauts d'alae chez l'adulte. Les expériences ont été réalisées au moins trois fois pour ces gènes (~ < ~/+ < + < ++ < +++).

kinases régulant possiblement les échanges à la membrane apicale (kinases C (Henkel and Betz 1995; Scepek, Coorssen et al. 1998; Ho, Slater et al. 2001; Carraro-Lacroix and Malnic 2006)), et des régulateurs de l'association V0-V1 pour confirmer certaines observations (comme Ac45, sur laquelle je reviendrai en discussion). Ensuite, j'ai inactivé des protéines VPS (« Vacuolar Protein Sorting ») impliquées dans le tri au niveau des endosomes (notamment les VPS de classe C (Peterson and Emr 2001), et du complexe GARP (Conibear, Cleck et al. 2003; Oka and Krieger 2005)) et la formation des vésicules intraluminales des compartiments endosomaux (ESCRT III (Gruenberg and Stenmark 2004; Peck, Bowden et al. 2004)), et des gènes du complexe exocyste potentiellement impliqué dans la fusion membranaire également à la membrane plasmique (TerBush, Maurice et al. 1996; Shin, Zhao et al. 2000; Hsu, TerBush et al. 2004; Beronja, Laprise et al. 2005). J'ai également ciblé différents gènes de la voie de signalisation Hedgehog conservés chez *C. elegans* (*hhat-1* et -2 orthologues de Skinny-Hedgehog, *rib-1* et -2 orthologues de TouT-Velu), des candidats positifs d'un cible de sensibilité à l'infection réalisé au laboratoire de J. Ewbank, *rab-11* pour son implication dans le recyclage apical (Khvotchev, Ren et al. 2003; Zhang, Ellis et al. 2004; Lock and Stow 2005), et différents gènes comme contrôles négatifs (Rabs de la voie endocytaire, enzymes de modification des collagènes, dynamine).

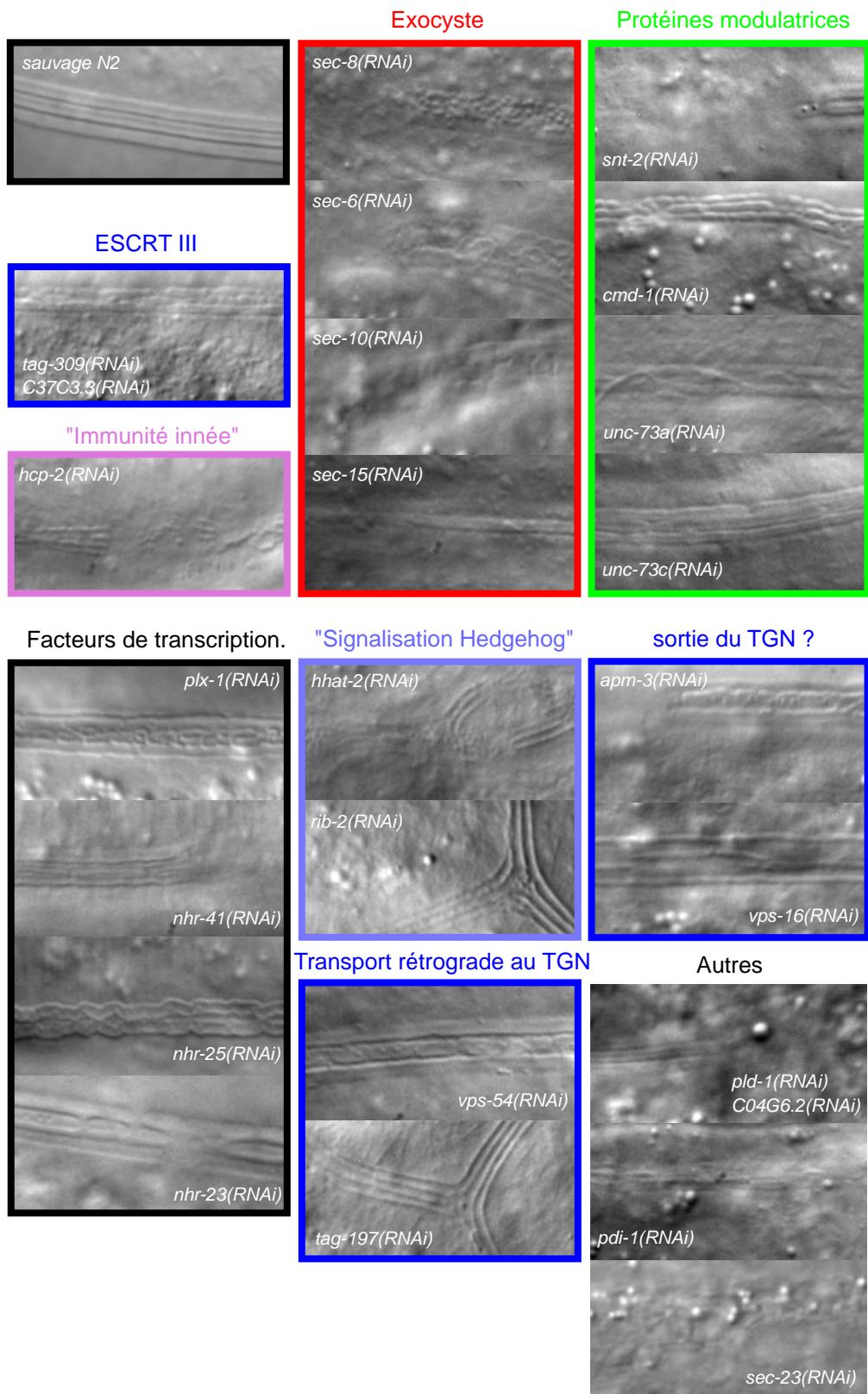
3.3.2 Résultats du cible.

Parmi les 49 ARNi testés, 25 se sont révélés positifs (Figure 61 et 62) et ont été confirmés deux ou trois fois par la suite (toujours sur 30 individus). Savoir si ce nombre relativement important découle du choix d'un critère de sélection trop « lâche », où d'une restriction « astucieuse » de l'ensemble des candidats à tester est sujet à débat et sera vérifié par la suite. Cependant ces résultats préliminaires ouvrent plusieurs possibilités intéressantes. Après un bref survol des résultats négatifs, j'ai choisi de ne commenter ici que quelques-uns des candidats confirmés.

3.3.2.1 Un bref commentaire sur les résultats négatifs du cible.

Parmi les résultats négatifs, il y a d'abord des contrôles négatifs comme *rab-5(ARNi)* et *rab-7(ARNi)*, qui présentent des phénotypes de létalité embryonnaire et de vacuolisation, mais pas de défauts d'alae, ce qui est attendu étant donné leur rôle dans la voie endocytotique classique. Il y a d'autre part des gènes qui ne sont probablement pas exprimés dans l'épiderme mais que j'ai testés parce que je voulais cibler les membres d'une famille protéique précise et que je ne connaissais pas les patrons d'expression des

Figure 62. DEFAUTS D'ALAE : RESULTATS POSITIFS DU CRIBLE ARNi CIBLE



différentes isoformes (cas des calmodulines et des synaptotagmines par exemple). Ensuite, il faut noter que tous les ARNi ne sont pas efficaces et pénétrants, et qu'un résultat négatif ne garanti pas l'absence d'implication du gène sous test dans le processus testé. Un très bon exemple est l'ARNi contre *rab-11* qui n'a donné aucun phénotype, alors que par d'autres méthodes d'ARNi il est létal au stade embryonnaire.

3.3.2.2 Le lien avec la « signalisation Hedgehog » serait confirmé.

De façon très nette, l'ARNi dirigé contre le gène de l'acétyltransférase des protéines de type Hedgehog, *hhat-2*, induit des défauts d'alae extrêmement similaires à ceux induits par les mutants « cuticule » de *vha-5*: *vha-5(mc38)Ex[E830Q]*, *vha-5(mc38)Ex[L786S]*, *vha-5(mc38)Ex[V844F]*, et certains mutants de gènes codants des PTRs et HRPs (Zugasti, Rajan et al. 2005). Il s'agit principalement d'interruptions et de bifurcations fréquentes des alae. Sur la base de mes observations, le phénotype de bifurcation des alae est typique d'une perturbation des gènes de la potentielle « voie Hedgehog ».

Par ailleurs, l'ARNi dirigé contre *rib-2*, un gène codant pour une enzyme de maturation d'un autre type (d'une autre famille que les PTC et PTR) de récepteur putatif des HRPs, induit également un défaut de bifurcation des alae au niveau caudal. N'ayant pas observé l'équivalent de ce phénotype au niveau de l'épiderme majeur, je suspecte un défaut spécifique des cellules épidermiques *hyp8* à *hyp11* (Figure 36). Je commenterai ces résultats davantage en discussion.

3.3.2.3 Le trafic entre endosomes et TGN influerait sur la sécrétion apicale.

tag-197(ARNi) (orthologue de *vps52*) et *vps54(ARNi)* induisent de faibles défauts d'alae, avec occasionnellement pour *tag-197(ARNi)* des défauts plus sévères de bifurcations caudales des alae, qui rappellent ceux de *rib-2(ARNi)*. Les protéines VPS (« Vacuolar Protein Sorting ») codées par ces deux gènes, Vps52p et Vps54p font partie du complexe d'arrimage GARP requis pour les échanges rétrogrades des endosomes vers le TGN (Conibear, Cleck et al. 2003; Oka and Krieger 2005; Quenneville, Chao et al. 2006) (cf. 1.2.3.1.3) (Figure 13). Le fait que le complexe GARP puisse influer sur la sécrétion apicale par les CMVs est envisageable dans la mesure où des échanges rétrogrades entre CMVs et Golgi pourraient être impliqués dans la maturation des CMVs.

3.3.2.4 Les protéines VPS de classe C.

Le complexe VPS de classe C impliqué dans les échanges Golgi-endosomes et endosomes-vacuole (Peterson and Emr 2001), serait également impliqué à la membrane de la vacuole de levure dans la régulation de la V-ATPase (Sambade, Alba et al. 2005), et semble important pour le recyclage à la membrane plasmique du récepteur à la transferrine (Kim, Ueda et al. 2003). Un rôle dans la voie de sécrétion par les CMVs n'est donc pas à exclure. Ainsi, parmi les deux ARNi testés pour le complexe VPS de classe C : *R06F6.2/vps11(ARNi)* et *vps16(ARNi)*, au moins *vps16(ARNi)* affecte les alae. Que *R06F6.2/vps11(ARNi)* n'ait pas eu d'effet est probablement du au fait que l'ARNi utilisé n'était pas pénétrant. En effet, *vps16(ARNi)* induit différents défauts dont une létalité embryonnaire (cf. Wormbase, que j'ai évité dans mon cible en soumettant les animaux à l'ARNi à partir de L1), alors que *R06F6.2/vps11(ARNi)* n'a aucun phénotype recensé sur Wormbase pour le clone bactérien disponible dans la banque d'ARNi de Julia Ahringer.

3.3.2.5 Le complexe ESCRTIII serait impliqué.

L'ARNi contre *tag-309* (codant une protéine apparentée à Snf7 du complexe ESCRTIII) a donné des défauts de forme des alae, voire des interruptions complètes. On a vu en introduction que les complexes ESCRT sont requis pour la formation des vésicules intraluminales (et futurs exosomes) dans les CMVs, et surtout pour l'incorporation des cargos dans ces vésicules. Les protéines HRPs sont sécrétées dans des exosomes issus de CMVs, et leur mauvaise sécrétion est responsable de défauts d'alpha comme ceux observés ici, pour *tag-309*. Il paraît donc raisonnable de proposer que les complexes ESCRT jouent un rôle dans la formation ou la composition des vésicules intraluminales des CMVs de l'épiderme de *C. elegans*, et que leur inactivation conduit à un défaut de sécrétion d'exosomes ou à la sécrétion d'exosomes anormaux, se traduisant par un problème de diffusion des HRPs.

3.3.2.6 L'exocyste dans la sécrétion apicale.

Les gènes *sec-6*, *sec-8*, *sec-10* et *sec-15* codent pour des sous-unités du complexe d'arrimage multimérique appelé exocyste. L'ARNi contre ces gènes induit des interruptions et des malformations des alae. Il semble donc que l'exocyste soit impliquée dans la sécrétion apicale dans les cellules épidermiques de *C. elegans*. Ce complexe était considéré comme typiquement basolatéral (Mostov, Verges et al. 2000) avant qu'on ne le trouve aussi apicalement dans les cellules photoréceptrices de la drosophile (Beronja, Laprise et al. 2005). On peut donc penser que l'exocyste ne serait pas spécifique d'un côté ou de l'autre

de la cellule, mais plutôt d'un mode de sécrétion donné qui nécessiterait un trafic intense par exemple, ou bien qui impliquerait des compartiments particuliers (relativement volumineux, multivésiculaires, etc.).

3.3.2.7 L'ARNi contre *hcp-2* confirme le lien entre la voie de sécrétion étudiée et l'immunité innée.

Le gène *hcp-2* code pour une protéine à domaine coiled-coil pour laquelle peu d'informations fiables existent. Je l'ai testé dans mon cible car l'ARNi contre ce gène rend les vers plus sensibles à l'infection par *Serratia marcescens* (J. Ewbank, communication personnelle). Cet ARNi, réalisé en contexte *rrf-3*, induit systématiquement des défauts de bifurcation des alae très similaires à ceux de l'ARNi contre *hhat-2*. Les protéines à domaine coiled-coil interagissent généralement avec d'autres protéines. Il serait donc intéressant d'une part de tester des interactions génétiques entre *hcp-2* et les autres candidats obtenus, et d'autre part de réaliser un cible double-hybride pour identifier les potentiels interacteurs de cette protéine.

3.3.2.8 Un résultat négatif intéressant : Ac45.

Ac45 est une sous-unité régulatrice du complexe V0 impliquée dans l'activation de la V-ATPase et peut-être dans son adressage. L'ARNi contre cette sous-unité conduit à différents phénotypes très sévères, dont une létalité embryonnaire dès les premières divisions cellulaires, et un arrêt de l'elongation (cf. discussion). D'autre part, les animaux qui éclosent présentent différents stades de létalité, des défauts d'osmorégulation (individus « Rod »), un défaut de croissance dramatique, conduisant à des adultes de la taille de larves L3, et des défauts de mue à tous les stades (suivant la sévérité de l'effet ARNi). De plus, ces animaux présentent une absence complète de marquage des organes chimiosensoriels par des colorants lipophiles vitaux de type DiO ou Dil. L'ensemble de ces phénotypes indique clairement un défaut de type défaut d'activité pompe de la V-ATPase. Le défaut de mue quant-à lui pourrait indiquer un défaut de sécrétion de composés cuticulaires ou d'enzymes de dégradation de la cuticule.

Cependant, les animaux adulte de taille L3, présentant des vacuoles, donc un défaut d'osmorégulation, des défauts morphogénétiques important de l'appareil reproducteur, des organes chimiosensoriels, et encore emprisonnés dans leur cuticule L4, ne présentent pas de défauts notables des alae ! Il semble donc qu'on ait affaire à un véritable résultat négatif, indiquant qu'Ac45 n'est pas requise pour la sécrétion des alae, et donc facultative pour fonction de V0 dans la sécrétion. Je reviendrai sur Ac45 dans la discussion.

TROISIEME PARTIE :

DISCUSSION - PERSPECTIVES.

- 1) Diversité des rôles de la V-ATPase chez *C. elegans*.
- 2) Investigation de la « signalisation Hedgehog » chez *C. elegans*.
- 3) Pourquoi une sécrétion apicale d'exosomes chez *C. elegans* ?

1 Rôles de V0 et de la V-ATPase contenant VHA-5 chez *C. elegans*.

Un fait frappant concernant la V-ATPase lorsque l'on explore la bibliographie abondante sur ce complexe, et dont j'ai pu aussi mesurer la prédictibilité dans notre système, c'est que ce complexe et ses sous-unités jouent de multiples rôles capitaux pour les eucaryotes à différentes périodes de leur développement, dans différents tissus, différents organites et avec différents partenaires. Je souhaitais ici tenter de déterminer quels rôles jouent la V-ATPase et son secteur V0 dans les différents epithelia étudiés, après avoir insisté sur l'aspect conservé du double-jeu de V0.

1.1 A quand remonte le double jeu de V0 ?

1.1.1 La double fonction de V0 est conservée.

1.1.1.1 Une fonction dans la sécrétion/fusion conservée de la levure aux vertébrés.

Jusqu'à maintenant, une fonction spécifique de V0 a été mise en évidence *in vivo* dans la fusion homotypique des vacuoles de levure (Bayer, Reese et al. 2003), dans la sécrétion des vésicules synaptiques chez la drosophile (Hiesinger, Fayyazuddin et al. 2005), et dans la sécrétion d'exosomes médiée par des corps multivésiculaires chez *C. elegans* (Liegeois, Benedetto et al. 2006). Il semble donc que cette fonction de V0 soit généralisée de la levure à la drosophile. De plus, les expériences initialement réalisées sur des liposomes contenant les sous-unités « c » et/ou « a » du secteur V0 (médiatophore) furent reproduites dans les cellules de vertébrés en transfectant le médiatophore dans des ovocytes de xénope (Leroy, Meunier et al. 1994), et une lignée neuronale déficiente pour la sécrétion régulée par le calcium (Falk-Vairant, Correge et al. 1996; Falk-Vairant, Correge et al. 1996).

1.1.1.2 Tous les secteurs V0 ne présentent pas d'activité spécifique.

Il existe des complexes V0 incapables de jouer un double rôle, selon la nature de la sous-unité « a » qu'ils contiennent. Ainsi, dans la levure, Stv1p est incapable de

complémenter *vph1* pour la fusion des vacuoles. Chez *C. elegans*, Samuel et moi avons observé un mutant probablement nul de *vha-7* (autre sous-unité « a » épidermique de la V-ATPase) généré par Samuel, qui ne présente pas de défauts évidents de la voie endolysosomale (d'après la MET) ni des alae, et qui n'aggrave pas du tout les phénotypes des mutants « cuticule » en contexte double-mutant (données non présentées). Indiquant que probablement le secteur V0 auquel VHA-7 ne participerait à des événements de fusion ni dans la voie endolysosomale, ni dans la sécrétion. Une façon de vérifier qu'il existe une différence entre VHA-5 et VHA-7 au niveau de la fusion, serait de tester les deux protéines chez la levure et de voir si elles complémentent *vph1* (cf. (Hiesinger, Fayyazuddin et al. 2005)).

Une question que l'on peut alors se poser est la suivante : sachant que les sous-unités « a » sont apparentées, le type le plus ancien est-il celui qui permet une double fonction ou une simple fonction du secteur V0 ? Autrement dit, à quel point cette fonction spécifique de V0 qui avait jusque là été plutôt ignorée est-elle fondamentale ?

1.1.1.3 Les mycètes excepté la levure possèdent une seule sous-unité « a ».

Une partie de la réponse vient probablement de l'article très récemment paru sur le secteur V0 de *Neurospora crassa* (Chavez, Bowman et al. 2006). Les auteurs y montrent que contrairement à ce que l'on aurait pu penser, le petit unicellulaire qu'est la levure est remarquablement doté parmi ses cousins mycètes puisque tous les autres mycètes étudiés ne présentent qu'une seule sous-unité « a » de V-ATPase. D'autre part, il apparaît que les phénotypes des mutations de sous-unités du secteur V0 (« a », « c », « c' », « c'' ») sont plus sévères que ceux des sous-unités V1 « C » et « H ». Cette dernière observation suggère que le secteur V0 a aussi chez *N. crassa* une/des fonction(s) indépendante(s) de V1. Comme *N. crassa* ne possède qu'un type de sous-unité « a », cela suppose que cette sous-unité « a » permet le double jeu de V0, et est donc du type Vph1p/VHA-5/V100. Il serait intéressant de voir si Stv1p échoue à compléter les mutants de cette sous-unité « a » tandis que Vph1p le ferait.

1.1.1.4 Le type ancestral des sous-unités « a » serait celui conférant une double fonction au secteur V0 ?

Pour en revenir à notre question de départ, on pourrait alors penser que le type ancestral de la sous-unité « a » était apparenté à Vph1p/VHA-5/V100, plutôt qu'à Stv1p (si on choisit l'hypothèse selon laquelle Stv1p aurait été acquise chez la levure plutôt que perdue chez tous les autres mycètes). De plus, le fait que Vph1p est également la sous-unité

« a » présentant le meilleur couplage à V1 pour la fonction pompe (Kawasaki-Nishi, Bowers et al. 2001), renforce cette interprétation.

D'autre part, la fonction spécifique de V0 est une particularité majeure qui distingue les V-ATPases des A- et F-ATPases pour lesquelles aucun rôle spécifique de leurs secteurs A0 ou F0 n'a été observé. Si on se laissait aller à spéculer il serait tentant d'imaginer que l'acquisition de la fonction spécifique de V0 liée à la sécrétion (rappelez-vous que l'acquisition de la sécrétion aurait précédé celle de l'endocytose d'après Jekely et coll. (Jekely 2003)) ait été une des clefs de la compartmentalisation des eucaryotes...

Autre élément de réflexion, je serais surpris que la V-ATPase qui est un très gros complexe multimérique et qui plus est bipartite et dissociable, ait été sélectionnée « en bloc » pour jouer son rôle de pompe à protons à l'origine. Il me semble plus aisés d'imaginer que les secteurs V0 et V1 présentaient des activités indépendantes avant que leur association ne soit sélectionnée. Pour renforcer cette idée, j'arguerai également du fait que les sous-unités des secteurs V0 et V1 des pompes de type V-ATPase sont codées par deux opérons indépendants chez les archaebactéries (Shibui, Hamamoto et al. 1997). La fonction de V0 ancestrale pourrait alors être la fonction V0-spécifique qui a été finalement si récemment découverte.

Tout ceci est très spéculatif, mais la connaissance croissante que l'on aura des unicellulaires primitifs et moins primitifs (comme la paramécie avec ses 17 sous-unités « a ») devrait permettre d'éclaircir cette question un jour.

1.2 Rôles de V0 et de la V-ATPase dans les cellules gaines des organes chimiosensoriels.

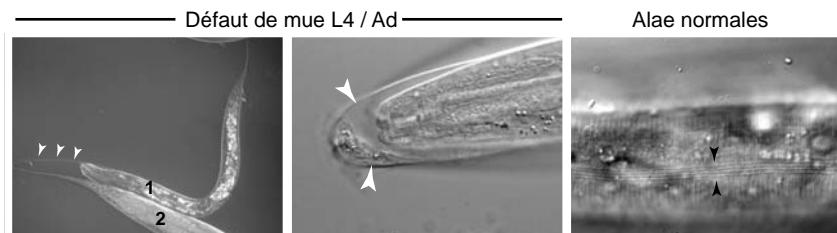
1.2.1 Indices d'une sécrétion affectée ?

1.2.1.1 Des défauts de la matrice extracellulaire.

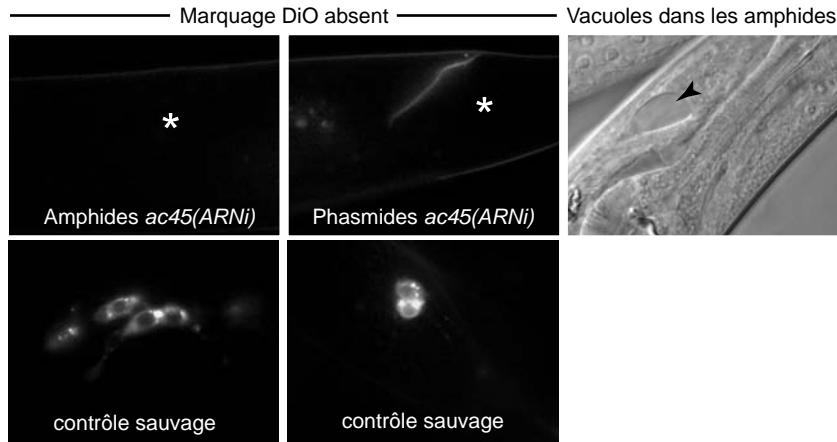
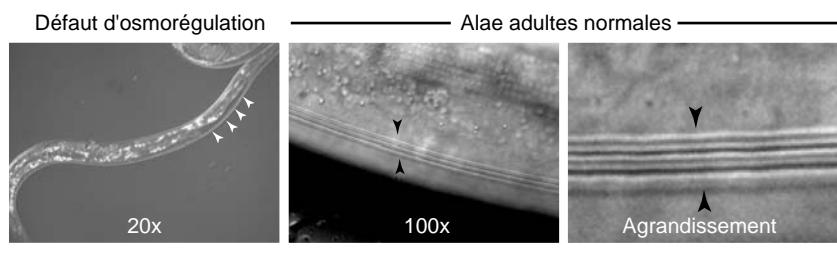
Au niveau des amphides, on a vu dans l'Article 1 qu'il semblait y avoir un défaut de matériel dense constituant la matrice extracellulaire. On pourrait penser que cette matrice est sécrétée par les cellules supports gaines, de la même façon que l'est la cuticule par l'épiderme hyp7, avec notamment l'implication de V0 dans ce processus. En effet au moins 4 HRPs sont exprimées dans ces cellules : *wrt-2, -5, -6, -8* toutes associées à la matrice extracellulaire ou à la cuticule (Hao, Aspock et al. 2006; Hao, Mukherjee et al. 2006;

Figure 63. DEFAUTS DUS A L'ARNi CONTRE Ac45/S1 CHEZ L'ADULTE

A Jeune adulte (DIC).



B Adulte (DIC).



LEGENDE.

A : Environ 50% des animaux soumis à l'ARNi contre Ac45/S1 présentent une croissance ralenties et fortement réduites (ver 1) comparé au sauvage (ver 2) (panneau de gauche), un défaut de mue L4/Adulte (tête de flèche panneaux de gauche et central) et un défaut de marquage au DiO (non présenté). En revanche les alae de la cuticule adulte sont normales (panneau de droite, les 4 bandes correspondantes au stade de jeune adulte).

B : Les 50% des animaux restant, ne présentent pas de phénotype de mue, ni aucun défaut d'alee (panneaux central et de droite en haut) mais un défaut d'osmorégulation du canal excréteur (têtes de flèches, panneau de gauche) et des cellules gaine des amphides (tête de flèche, panneau en bas à droite), ainsi qu'un défaut de marquage au DiO (asteriskes, panneaux du bas, gauche et centre).

Ces phénotypes suggèrent que chez les vers qui ont subit l'ARNi contre Ac45/S1, la sécrétion n'est pas affectée (alee normales), tandis que l'osmorégulation l'est (défauts du canal, des cellules gaine des amphides, défaut de coloration DiO).

Liegeois, Benedetto et al. 2006) dont deux sont sécrétées via un processus dépendant de V0 dans le syncytium hyp7 (Liegeois, Benedetto et al. 2006). Cependant, les mutants « cuticule » de VHA-5 (L786S, E830Q et V844F) ne semblent pas présenter d'accumulations de VHA-5, de CHE-14, de RDY-2, de TSP-15, de WRT-2 ou de WRT-8 dans ces cellules. De plus, ces mutants ne présentent pas de défauts évidents de marquage DiO ou Dil. Ils présentent toutefois des comportements différents des vers sauvages et des mutants « canal » en ce sens qu'ils semblent moins attirés par la nourriture. Il faudrait effectuer des tests de chimiosensation sur ces mutants pour en avoir le cœur net. Il est donc tout de même possible que la sécrétion soit affectée de manière mineure dans ces cellules.

1.2.1.2 Des structures multilamellaires affectées.

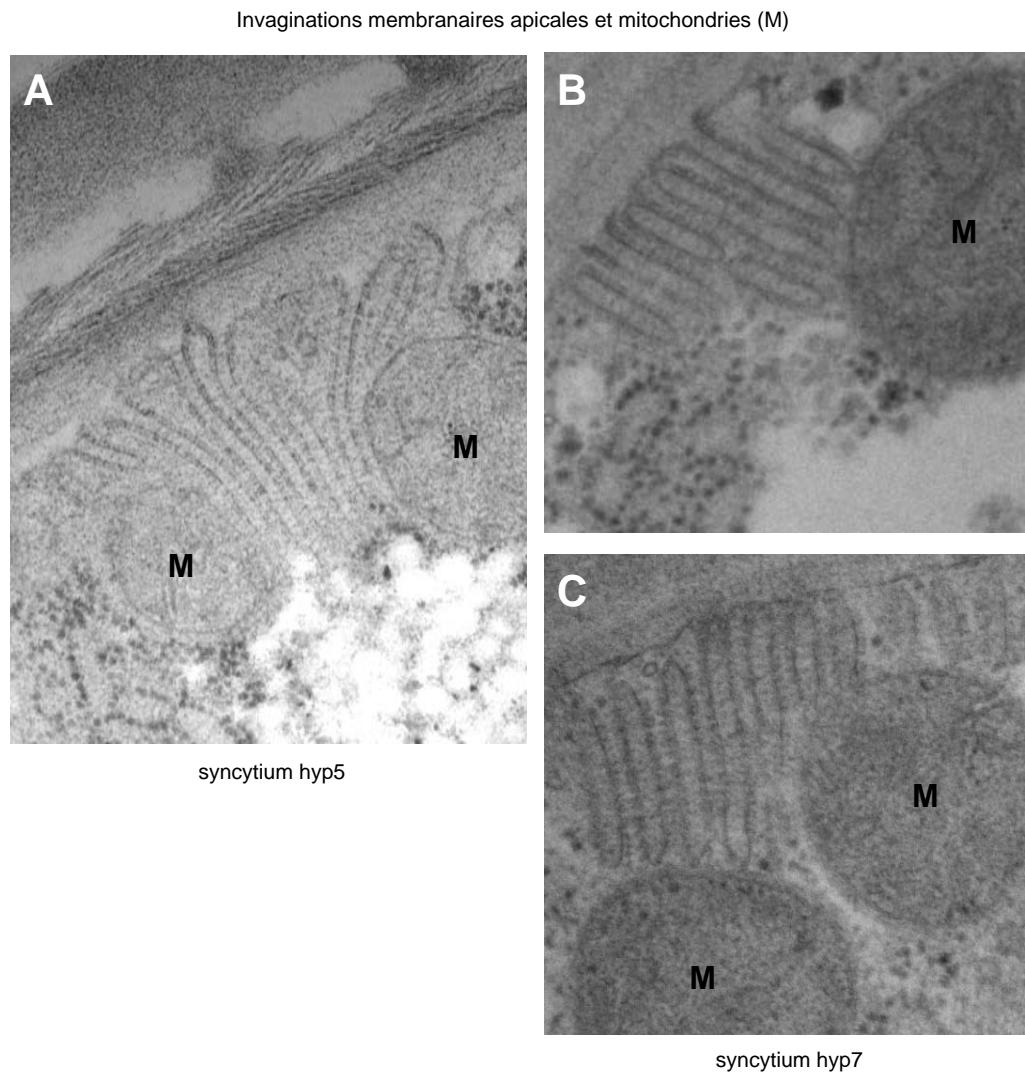
Il a été montré dans l'Article 1 que des structures lamellaires étaient affectées dans les cellules gaines des amphides des mutants *vha-5*. Etant donné que le secteur transmembranaire V0 de la V-ATPase est impliqué dans la sécrétion, on peut imaginer que l'absence de VHA-5 perturberait ainsi la morphogenèse de ces structures. Cependant, cela n'engage que moi, mais il me semble plus probable que si le secteur V0 ou la V-ATPase entière jouent un rôle dans la morphogenèse de ces structures, celui-là passe par des propriétés organisatrices de microdomaines (cf. 4.4) indépendantes de la fonction spécifique de V0 dans la sécrétion.

1.2.2 L'osmorégulation est peut-être plus affectée.

1.2.2.1 L'apport de l'ARNi contre Ac45 (Figure 63).

Ac45 est une sous-unité régulatrice de V0 qui permet son couplage à V1. L'ARNi contre Ac45 m'a permis d'obtenir des vers adultes présentant de graves défauts de croissance (de la taille d'une L3), d'osmorégulation, et un défaut total de marquage DiO, mais des alae parfaitement normales. Cette observation indique que la sécrétion dépendante de V0 n'est pas affectée dans l'épiderme de ces animaux alors que toutes les fonctions associées à la pompe (comme attendu) le sont. Et le fait que le marquage DiO soit défectueux suggère fortement que ce défaut résulte d'un défaut de pompe V-ATPase et non d'un problème de sécrétion.

Figure 64. LES INVAGINATIONS DE MEMBRANE APICALE DANS L'EPIDERME DE *CAENORHABDITIS ELEGANS*



LEGENDE.

Les invaginations de membrane de la membrane apicale sont toujours associées aux mitochondries (M) comme observé dans les cellules hyp5 (A) et hyp7 (B et C) en microscopie électronique à transmission après cryofixation à haute pression (HPF).

Ces structures sont très probablement impliquées dans l'osmorégulation à la membrane apicale. La V-ATPase est en effet trouvée en abondance à ce niveau par immunomarquage à l'or colloïdal, et il est raisonnable de penser que les mitochondries sont associées pour fournir l'ATP nécessaire au fonctionnement de la V-ATPase. On peut remarquer également que ces structures sont recouvertes d'un manteau qui doit être requis pour les maintenir. La nature de ce manteau (clathrine, cavéolines, actine, etc.) n'est pas connue.

1.2.2.2 Le rôle des corps lamellaires.

Les structures lamellaires observées dans les cellules gaines des amphides et affectées chez *vha-5(mc38)* et *rdy-2(mc39)*, rappellent les invaginations membranaires (également perturbées chez *vha-5(mc38)* et *rdy-2(mc39)* présentes à la membrane apicale du syncytium hyp7. La présence d'invaginations ou d'évaginations (microvillosités etc..) qui augmente la surface d'échange à la membrane apicale de cellules polarisées est très étroitement associée à l'osmorégulation et à la fonction de pompe à protons de la V-ATPase (Ehrenfeld and Klein 1997; Klein, Timme et al. 1997; Brown and Breton 2000; Katoh, Hyodo et al. 2003). De plus, les cellules qui présentent ces caractéristiques expriment la V-ATPase à leur membrane apicale et sont systématiquement riches en mitochondries, probablement pour fournir l'ATP nécessaire au fonctionnement de la pompe (ostéoclastes, cellules épithéliales du rein, de la peau d'amphibien, etc.) (Harvey and Wieczorek 1997). En accord avec ces observations, dans le syncytium hyp7 de *C. elegans*, les invaginations membranaires apicales sont non seulement presque systématiquement associées à des mitochondries (Figure 64), mais la localisation à la membrane apicale de VHA-5 correspond précisément à ces invaginations de membranes (comme observé par immunomarquage à l'or colloïdal en MET). En outre, VHA-5 (secteur V0) et VHA-8 (secteur V1) colocalisent admirablement à la membrane apicale, suggérant que c'est toute la pompe qui est localisée dans ces structures.

Il découle de ces observations, que les structures lamellaires observées dans les cellules gaines des amphides et similaires à celles du syncytium hyp7 pourraient représenter des structures d'osmorégulation impliquant la V-ATPase. Il serait intéressant de confirmer la localisation de VHA-5 et de VHA-8 ::GFP au niveau de ces structures par immunomarquage à l'or colloïdal en MET dans les cellules gaines des amphides et phasmides.

1.2.2.3 L'élargissement de la poche des amphides.

En plus des défauts cités précédemment, l'élargissement de la poche des amphides qui apparaît vide ou remplie de fluide clair aux électrons rappelle clairement un défaut d'osmorégulation, et dans ce cas serait imputable à un défaut de pompe à protons plutôt qu'à un défaut de sécrétion médiée par V0. L'absence apparente de matériel dans la poche pourrait résulter d'une dégradation de celui-ci, d'une désorganisation qui ne le rend plus dense aux électrons, ou d'un défaut de sécrétion. Ce dernier ne serait cependant pas critique pour le marquage DiO, dont l'absence s'expliquerait plutôt par un défaut d'osmorégulation, comme observé plus haut. D'autre part, la sécrétion à ce niveau n'impliquerait pas de CMVs et pourrait dépendre indirectement de l'activité pompe plutôt que de celle de V0 seul (cf. 4.2).

Comme VHA-5 est a priori la seule sous-unité « a » exprimée dans les cellules supports gaines des amphides, son inactivation toucherait toute fonction associée à cette protéine, et donc aussi bien la fonction V-ATPase que la fonction V₀-spécifique. D'après les observations que je viens de faire, il semble au final qu'un défaut de V-ATPase (V₁+V₀) rendrait mieux compte des phénotypes observés au niveau des amphides dans les mutants *vha-5(mc38)*, même si on ne peut exclure que la fonction spécifique de V₀ ait un rôle moindre dans ces cellules.

1.3 Rôles de V₀ et de la V-ATPase dans le système excréteur.

1.3.1 Un rôle évident dans l'osmorégulation.

La létalité Rod au stade L1 des mutants nuls et des ARNi contre les différentes sous-unités de la V-ATPase (Ac45 incluse) se caractérise par un cœlome rempli de fluide comprimant tous les tissus du ver. De plus, que ce soient les mutants nuls (*mc37* et *mc38*), les ARNi contre les sous-unités V₀ et V₁, l'ARNi contre Ac45, ou les mutants « canal » hypomorphes (W190A et R191A), tous présentent des phénotypes de morphologie affectée du canal, tout à fait comparables à ceux des mutants *exc-2*, *-3*, *-5*, *-7* et *-8* (Figure 36) (Buechner, Hall et al. 1999). Ces observations sont suffisantes pour montrer d'une part que ce qui explique ces défauts est un défaut de la V-ATPase et non seulement de son secteur V₀. Et d'autre part, ce sont selon toute probabilité des défauts d'osmorégulation. Pour le démontrer biochimiquement, il faudrait qu'on parvienne à révéler que le pH ou les équilibres ioniques sont affectés dans ce cas. Samuel a passé du temps à mettre au point des rapporteurs fluorescents sensibles au pH malheureusement sans succès. Il n'est d'autre part pas évident de manipuler le canal excréteur du ver pour le charger en colorants sensibles au pH car les échanges de ces colorants entre le lumen et l'extérieur ne sont pas passifs. Des essais de croissance des vers sur des milieux de pH différents ont également été tentés sans succès. Cependant, nous n'avons pas encore testé l'effet de la concentration en sels dans le milieu de culture.

1.3.2 Un rôle mineur dans la sécrétion ?

Samuel a observé en microscopie électronique chez le mutant « cuticule » *vha-5(mc38) ;mcEx[E830Q]* des corps multivésiculaires de grosse taille comportant quelques vésicules intralumenales. Il n'est donc pas totalement exclu qu'une sécrétion impliquant des CMVs ait lieu également dans la cellule excrétrice. Cependant, ces observations ont porté sur un trop faible nombre d'animaux, et n'ont pas été faites de manière systématique. D'autre part ces CMVs ne ressemblent pas aux CMVs denses que l'on observe dans l'épiderme des mêmes mutants, ni même aux CMVs clairs.

1.4 Rôles de V0 et de la V-ATPase dans l'épiderme.

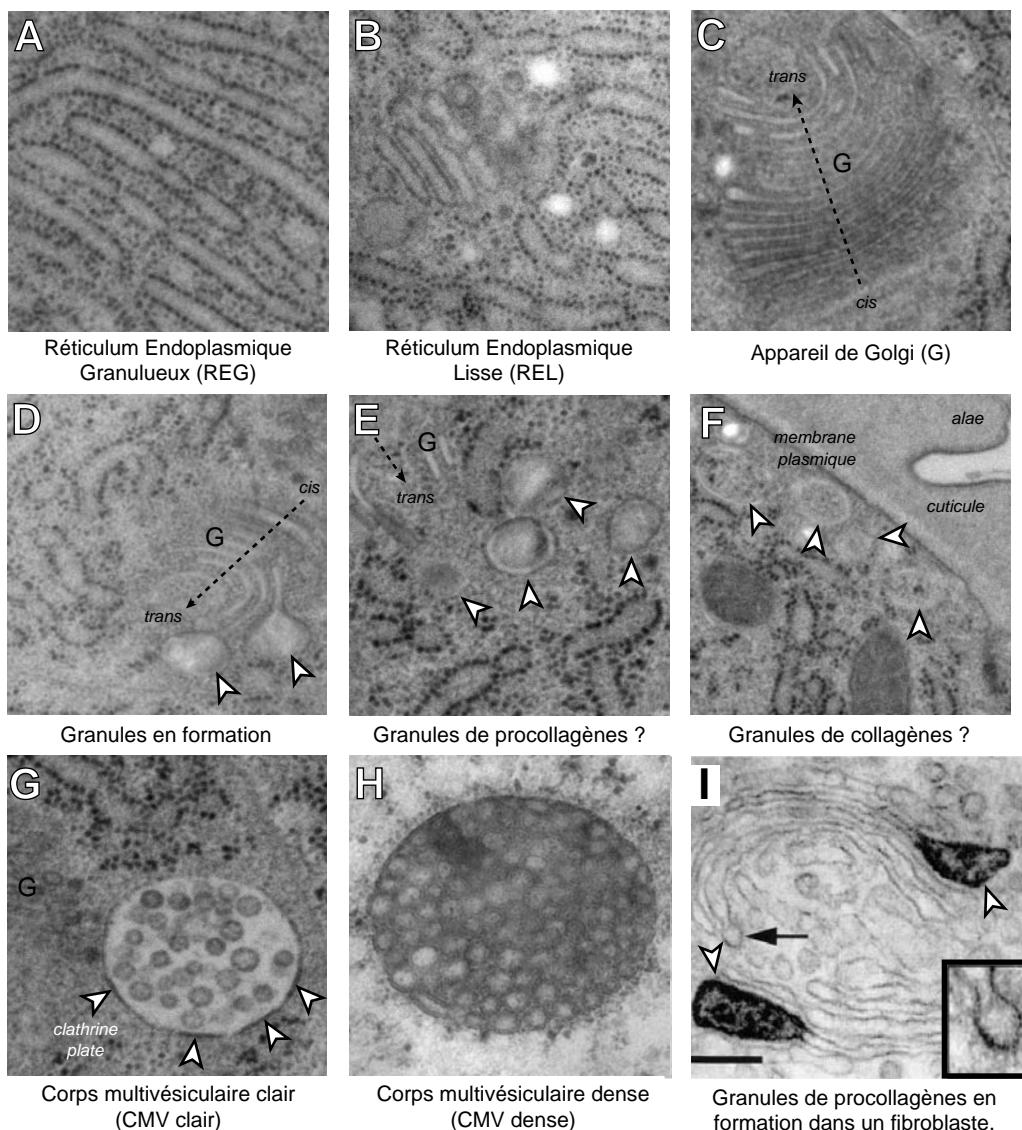
1.4.1 Rôle osmorégulateur.

Les mutants nuls *vha-5* présentent au stade L1 des défauts des invaginations membranaires apicales du syncytium hyp7, ainsi que des cavités entre la cuticule et la membrane plasmique à ce niveau (Article 1). De plus, dans les mutants *vha-5(mc38)* sauvés par une construction abolissant l'expression dans l'épiderme adulte, on observe un détachement de la cuticule et de l'épiderme, et la formation de cavités. Ensuite, les animaux mosaïques qui perdent l'expression dans l'épiderme et le canal meurent plus vite que ceux qui la perdent seulement dans le canal. Ces phénotypes seraient attribuables à un défaut d'osmorégulation. Si l'on considère ce que j'évoquais plus haut à propos des structures lamellaires des cellules gaines des amphides, les invaginations membranaires où VHA-5 et très probablement VHA-8 (Ji, Choi et al. 2006) se concentrent, constitueraient alors des organites d'osmorégulation, dont le fonctionnement dépendrait de la fonction pompe de la V-ATPase et non de la fonction spécifique de V0.

1.4.2 Rôle sécrétoire

L'étude des mutants du gène *vha-5* a permis de mettre en évidence une voie de sécrétion impliquant des exosomes. Ceux-ci contiennent les protéines VHA-5, WRT-2 et probablement WRT-8, CHE-14, RDY-2 et sont sécrétés dans la cuticule basale. Il est également probable que QUA-1 (Hao, Mukherjee et al. 2006) et la métalloprotéinase NAS-37 (Davis, Birnie et al. 2004) soient sécrétés par cette voie, ce que je souhaite vérifier bientôt. Cependant, il est certain que les collagènes ne sont pas sécrétés par cette voie. Dans les

Figure 65. LA SECRETION APICALE EPIDERMIQUE CHEZ *CAENORHABDITIS ELEGANS*



LEGENDE.

A - C : Compartiments de la biosynthèse des protéines sécrétées chez un ver au cours de la mue L4/adulte dans le syncytium seam.

D - F : Granules de sécrétion (têtes de flèches) observés au cours de la mue L3/L4 dans le syncytium seam. Les granules (E) se forment en bourgeonnant à partir des citernes du Golgi (D) avant de rejoindre la face apicale de la cellule (F) pour être sécrétés dans la cuticule. Ce type de granules est très probablement impliqués dans le transport des collagènes.

G : Corps multivésiculaire clair impliqué dans la sécrétion d'exosomes dans les cellules épidermiques. On peut distinguer les manteau non conventionnels de clathrine (têtes de flèches) au sites à partir desquels se forment les vésicules intraluminales. Ici il s'agit du syncytium seam qui possède probablement les mêmes voies de sécrétion que le syncytium hyp7.

H : Corps multivésiculaire dense, correspondant probablement à un endosome tardif de la voie d'endocytose-dégradation.

I : Formation de granules de collagènes (têtes de flèches) dans un fibroblaste. La flèche et l'encart correspondent à la formation d'une vésicule d'échange couverte de clathrine qui se forme sur une autre citerne.

fibroblastes de vertébrés les collagènes sont généralement triés au niveau des dernières citerne golgiennes dans des granules de sécrétions de taille bien supérieure à des exosomes. En effet les fibrilles de collagène qui atteignent 300 nm ne pourraient être contenues dans des vésicules. En observant des coupes en microscopie électronique à transmission après cryofixation à haute pression, j'ai pu observer des structures qui rappellent fortement ce qui a été observé chez les vertébrés (Figure 65). Ces structures bourgeonnent à partir du Golgi et forment des granules d'environ 300 nm.

Il existerait donc deux modes de sécrétion épidermiques dont l'un seulement requerrait la fonction spécifique du secteur V0 contenant VHA-5.

1.4.3 Importance au cours des mues.

1.4.3.1 Réorganisation de la V-ATPase et de l'actine corticale avant chaque mue.

Au cours de mon travail j'ai observé que la sous-unité « a » VHA-5 du secteur V0 de la V-ATPase forme des spots réguliers dans l'épiderme de *C. elegans*. Mieux, avant chaque mue, lorsque l'actine apicale se réorganise en fibres parallèles circonférentielles, les spots colocalisent avec l'actine, formant des lignes pointillées le long de ces fibres. D'autre part, la sous-unité « E » VHA-8 du secteur V1 colocalise parfaitement avec VHA-5 au niveau de ces spots apicaux au cours du développement larvaire et chez l'adulte. Cela suggère que ces spots sont des zones de forte densité en complexe V-ATPase (V1+V0). Comme V0 ne possède pas de site de fixation à l'actine, mais qu'en revanche les sous-unités « B » et « C » du secteur V1 en ont, l'explication la plus parcimonieuse serait que la V-ATPase est associée au réseau d'actine apicale via son secteur V1. Ainsi l'actine épidermique apicale, via sa fixation au secteur V1, pourrait permettre la localisation correcte de la V-ATPase épidermique apicale chez *C. elegans*. On pourrait aussi interpréter cette observation d'une autre manière : la localisation de la V-ATPase serait déterminée par le complexe V0 (qui aurait une préférence pour certains radeaux lipidiques par exemple, cf. paragraphe 4.4), et l'association avec V1 permettrait inversement d'ancrer les fibres apicales d'actine à la membrane apicale. En ce cas on devrait s'attendre à un défaut d'organisation de l'actine corticale en l'absence de V0 ou V1, ou lorsque leur association est perturbée. Il serait intéressant d'observer l'ABD ::YFP en contexte *Ac45(ARNi)*, ou en contexte mutant pour le trafic du cholestérol pour vérifier si ces conditions perturbent la réorganisation apicale de l'actine lors des mues.

1.4.3.2 Rôle de la sous-unité Ac45 lors des mues.

Lorsqu'on réalise l'ARNi contre Ac45 entre les stades L1 et adulte, on observe dans plus de 70% des cas un défaut sévère de la mue , surtout à la transition L4-Adulte (Figure 63). Il se caractérise par des animaux adultes de la taille de larves L3, présentant des alae normales sur la cuticule adulte, mais emprisonnés dans leur cuticule L4. Ce phénotype suggère que la sécrétion des constituants cuticulaires est normale aussi bien pour les collagènes que pour les composants mineurs impliqués dans la définition de la structure des alae, malgré le défaut de mue. La fonction invalidée est impliquée dans le détachement de la vieille cuticule et ne semble pas être celle spécifique de V0 et impliquée dans la sécrétion des HRPs, puisque la cuticule adulte est normale. Il s'agirait donc d'une fonction liée à la V-ATPase entière ou bien spécifique à Ac45.

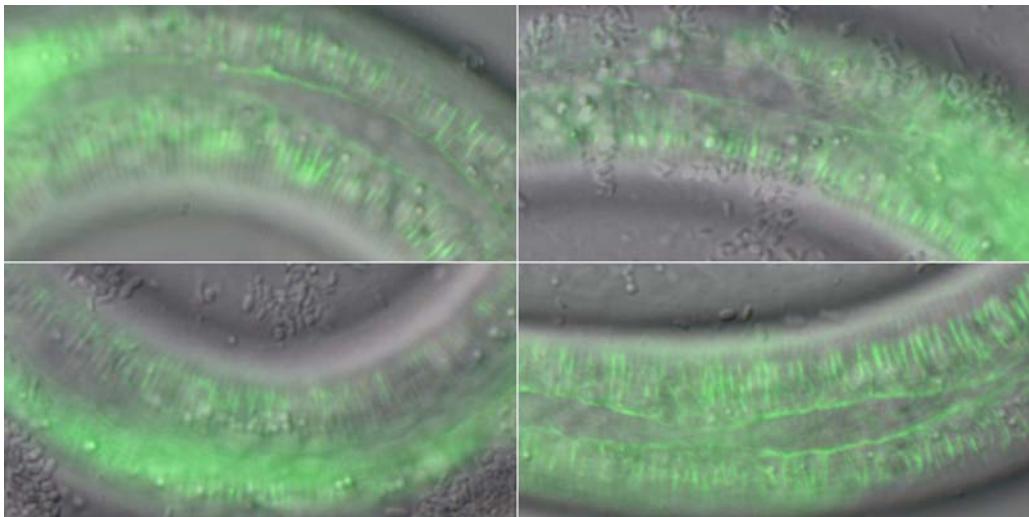
1.4.4 Un scenario explicatif des fonctions de V0 et V1 lors des mues.

1.4.4.1 Un rôle de la V-ATPase lors des mues chez *C. elegans* ?

Le fait que la V-ATPase (à la fois V0 et V1) se réorganise avant chaque mue, ainsi que les défauts de mue observés lorsque l'on inactive Ac45 par ARNi, indiquent que la V-ATPase joue probablement un rôle de premier plan lors des mues.

En fait un défaut de mue est également observé chez les mutants pour la métalloprotéinase NAS-37, sécrétée par l'épiderme avant chaque mue pour permettre le détachement de la vieille cuticule de l'épiderme (Davis, Birnie et al. 2004; Suzuki, Sagoh et al. 2004). On pourrait donc imaginer que le rôle de la V-ATPase dans la mue serait lié à l'activité des métalloprotéinases comme NAS-37 ou à celui d'autres enzymes requises pour la dégradation de la cuticule. Or, l'expression des protéases de dégradation de la matrice extracellulaire et leur activité sont augmentées par la baisse du pH extracellulaire induite par l'activité de la V-ATPase (Sennoune, Luo et al. 2004; Harrell, McCawley et al. 2005; Lu, Qin et al. 2005; Shimokawa, Kumaki et al. 2005; Henriksen, Sorensen et al. 2006; Rofstad, Mathiesen et al. 2006). On peut donc penser que la V-ATPase joue un rôle dans la mue en favorisant l'expression et l'activation des métalloprotéinases (Davis, Birnie et al. 2004; Suzuki, Sagoh et al. 2004).

Figure 66. LES CABLES D'ACTINE CORTICALE SE SITUENT EN VIS A VIS DES ANNULI.



LEGENDE.

Superpositions du marquage ABD::YFP décorant les câbles d'actine lors de la mue L3-L4, et de l'image en DIC pour quatre vers différents. On observe que les câbles d'actine correspondent aux structures en relief des annuli.

1.4.4.2 Pourquoi la V-ATPase se réorganiserait en bandes circonférentielles comme l'actine ?

J'ai pu observer que l'espacement des câbles principaux d'actine avant les mues correspondait à celui des annuli cuticulaires (Figure 66). Comme V0 est impliqué dans la sécrétion de constituants « morphogénétiques » de la cuticule, il est possible que cette sécrétion soit responsable non seulement de la forme des alae, mais aussi de celle des annuli. En effet, les mutants « cuticule » de *vha-5* sont affectés au niveau de leurs annuli même si nous n'avons pas insisté sur ce point (cf. Article 2).

Partant de cette idée, on pourrait reconSIDérer le rôle de la réorganisation de la V-ATPase le long des câbles d'actine comme un moyen d'aligner les secteurs V0 de la membrane apicale pour créer des domaines circonférentiels où l'exocytose serait facilitée. La sécrétion s'effectuerait alors en bandes, ce qui serait reflété par les annuli. Le secteur V1 en s'associant à l'actine d'un côté et V0 servirait d'adaptateur pour relocaliser V0.

Mais alors V0 serait couplé à V1, et inaccessible pour la sécrétion ? Oui dans un premier temps, mais pas définitivement.

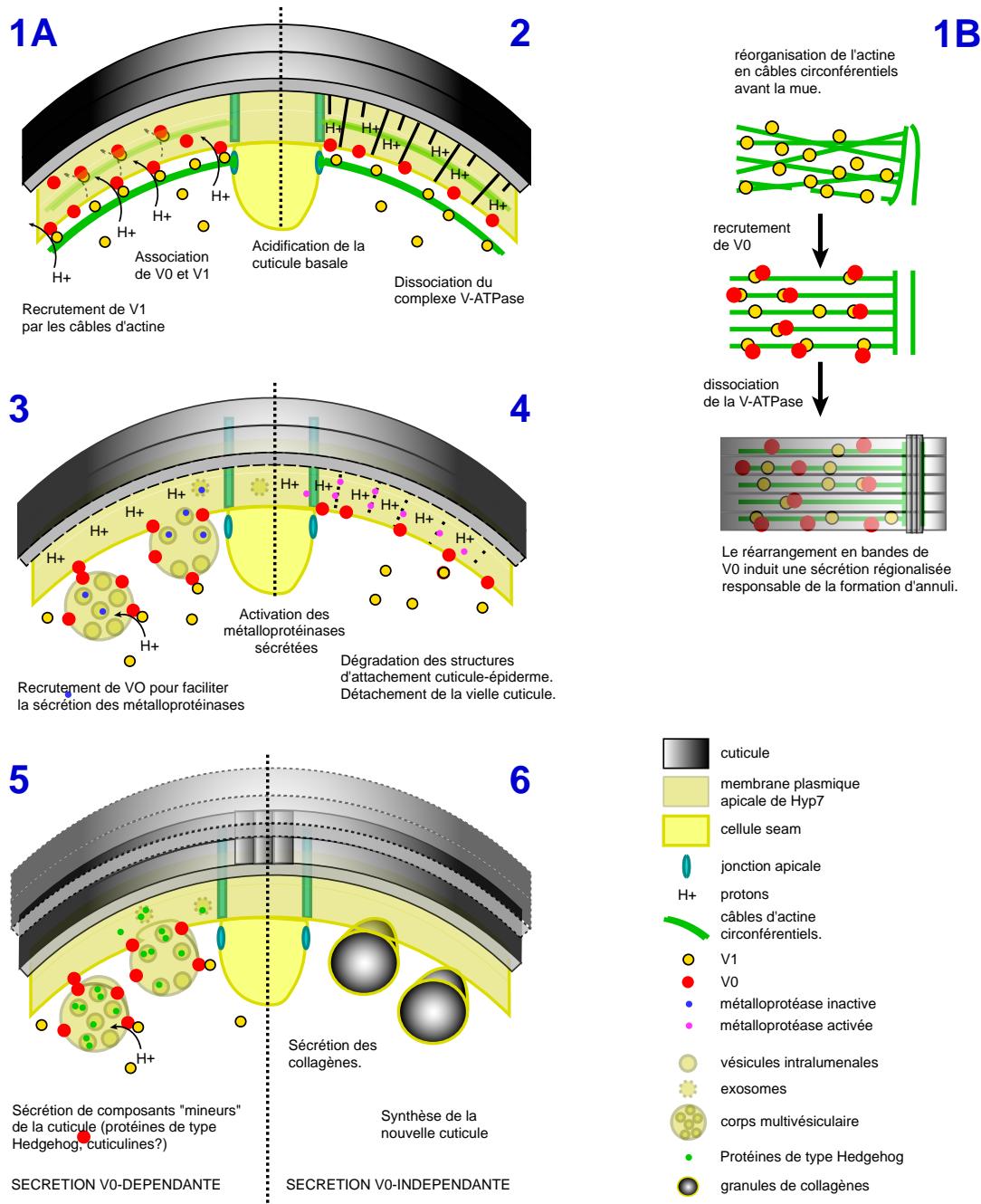
En effet, à ce stade l'acidification de la matrice extracellulaire par la V-ATPase serait requise pour dégrader les zones d'attache de la cuticule à l'épiderme, en activant les métalloprotéinases. En même temps, l'animal s'immobilise car il se trouve à un stade fragile où sa nouvelle cuticule n'est pas encore formée et où l'ancienne ne peut plus vraiment lui servir de squelette. On peut donc imaginer que deux phénomènes se produisent alors pour favoriser la dissociation de la V-ATPase.

D'une part l'acidification de l'espace extracellulaire ferait que le différentiel de pH entre cytosol et cuticule deviendrait défavorable à l'association V0-V1 (cf. 4.3.1.6). D'autre part, la déplétion des réserves énergétiques par l'activité de la V-ATPase et la synthèse de la nouvelle cuticule alors que le ver ne peut plus se nourrir, comme lors de la mue chez *Manduca sexta*, mimeraient une situation de famine (cf. 4.3.1.1), qui induirait la dissociation du complexe V0-V1. C'est ainsi que V0 se trouverait libéré pour faciliter la fusion des CMVs (contenant des facteurs de morphogenèse cuticulaire) à la membrane apicale, et de façon régionalisée. J'ai résumé l'ensemble de ce modèle qui n'engage que moi dans la Figure 67.

1.5 Un rôle de la V-ATPase dans l'elongation ?

L'ARNi dirigé contre le gène codant Ac45/S1 (*Y55H10A.1*), sous-unité régulatrice de l'assemblage V0-V1, induit des phénotypes embryonnaires précoces, en plus des défauts

Figure 67. UN MODELE POUR LES ROLES DE LA V-ATPASE LORS DES MUES



Modèle de fonctionnement de la V-ATPase dans l'épiderme de *C. elegans* lors des mues.

1A. et 1B. Des câbles d'actine circonférentiels se forment sous la membrane apicale (déjà décrit par Costa et coll. 1997). Les sous-unités B et C du complexe V1 se fixent sur l'actine, alignant les secteurs V1 le long des câbles. Les secteurs V1 recrutent les secteurs V0 transmembranaires le long des câbles (cette étape serait dépendante d'Ac45/S1 d'après mes résultats), formant des complexes V-ATPase actifs qui acidifient la cuticule basale.

2. La V-ATPase se dissocie lorsque le différentiel de pH transmembranaire augmente de façon critique.

3. Les secteurs V0 libérés de l'association avec V1 peuvent favoriser la fusion des CMVs contenant entre autres des enzymes de dégradation de la cuticule (métalloprotéinases, collagénases).

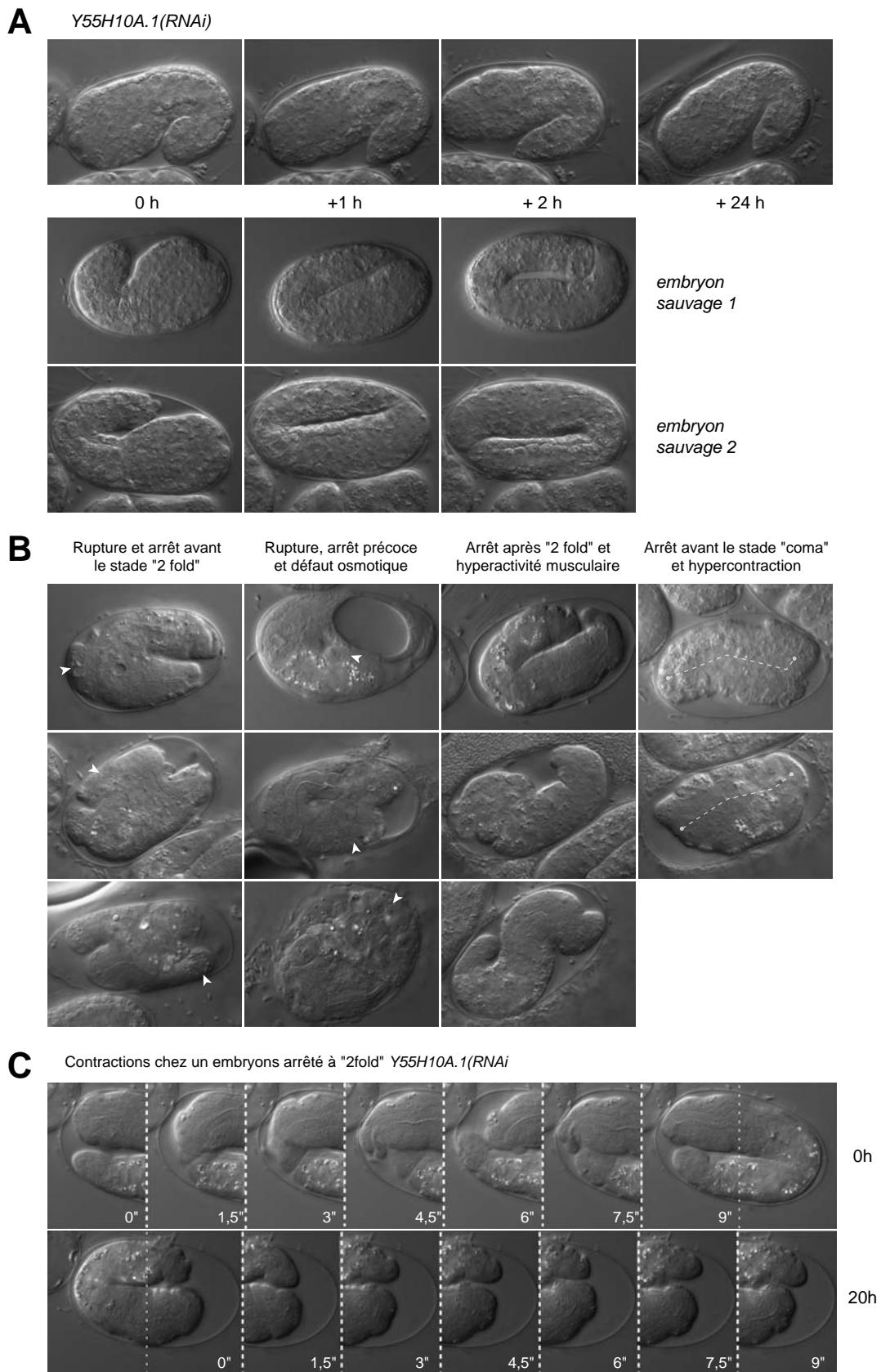
4. Les protéases sécrétées sont activées par le pH acide de la cuticule basale et commencent à dégrader les structures d'attachment de la cuticule à l'épiderme. Alternativement le pH acide suffit à défaire ces complexes. La vieille cuticule se détache.

5. et 6. Les constituants mineurs de la cuticules sont sécrétés par la voie dépendante de V0 impliquant des CMVs (5.), tandis que les collagènes sont sécrétés via une voie un dépendante de V0 et impliquant des granules (6.), pour synthétiser la nouvelle cuticule.

osmotiques et de mue constatés chez les larves et adultes (Figure 68). Ainsi, on peut observer des animaux arrêtés dans leur élongation embryonnaire entre les stades « 1,5 fold » et un peu plus de « 2 fold ». D'autres embryons apparaissent hypercontractés, certains présentent des ruptures dorsales ou ventrales, d'autres probablement plus âgés mais arrêtés à « 2 fold » présentent un phénotype sévère d'hyperactivité (Figure 68). La caractérisation plus précise de ces phénotypes est en cours, mais de façon très intéressante, ces phénotypes sont typiquement ceux qui intéressent l'autre groupe du laboratoire.

Ces observations pourraient être interprétées de deux manières : soit Ac45 possède par elle-même, hors de la V-ATPase un rôle dans l'élongation de l'embryon chez *C. elegans*, soit la V-ATPase elle-même est impliquée dans ce processus. Cette dernière hypothèse est intéressante dans la mesure où la V-ATPase entretient des liens physiques avec le cytosquelette d'actine, et avec la β -intégrine (cf. 4.3). A ce stade de l'investigation, je ne peux cependant pas exclure que les phénotypes obtenus reflètent indirectement des défauts de différenciation et d'identité cellulaires.

Figure 68. PHENOTYPES EMBRYONNAIRES DE L'ARNi CONTRE LA SOUS-UNITE Ac45 / S1



2 Investigation de la « signalisation Hedgehog » chez *C. elegans*.

2.1 Spécificité apicale de la sécrétion des Warthog ?

2.1.1 Sécrétion polarisée des protéines de type Hedgehog (HRPs).

L'un des processus clefs de la signalisation Hedgehog est la sécrétion différentielle des protéines Hedgehog modifiées par des lipides (palmitate, cholestérol) et des protéines n'ayant pas subit ces modifications post-traductionnelles (Porter, Ekker et al. 1996; Porter, Young et al. 1996; Jeong and McMahon 2002; Chen, Li et al. 2004; Panakova, Sprong et al. 2005; Tian, Jeong et al. 2005; Eaton 2006). En effet, seules les protéines Hedgehog sécrétées apicalement sont modifiées par des lipides et capables de jouer le rôle de morphogène de Hedgehog. L'absence de telles modifications compromet la sécrétion apicale de Hedgehog alors sécrété aussi basolatéralement, et les protéines natives ainsi sécrétées n'ont pas de propriétés morphogénétiques (Porter, Ekker et al. 1996; Porter, Young et al. 1996; Jeong and McMahon 2002; Gallet, Rodriguez et al. 2003; Chen, Li et al. 2004; Gallet, Ruel et al. 2006). La modification des HRPs par les lipides leur confère une tendance à s'associer à des environnements lipidiques riches en cholestérol (Peters, Wolf et al. 2004; Gallet, Ruel et al. 2006), ce qui explique probablement en partie pourquoi on retrouve ces HRPs du côté apical des cellules (les compartiments apicaux sont plus riches en cholestérol et contiennent notamment des DRMs) .

2.1.2 Des modifications post-traductionnelles sont probablement requises pour la fonction des HRPs chez *C. elegans*.

En inactivant par ARNi le gène *hhat-2* qui code une Hedgehog-acétylase (apparentée à Skinny-Hedgehog chez les insectes et les vertébrés), et qui est donc potentiellement responsable de modifications post-traductionnelles sur les protéines Warthog, j'ai observé des phénotypes similaires à ceux induits par ARNi contre les protéines de type Hedgehog et

leurs récepteurs putatifs : protéines PTC et PTR chez *C. elegans*. Ainsi j'ai obtenu des animaux Dpy, stériles, présentant des alae anormalement interrompues et bifurquées (Figure 62), une vulve protubérante, une queue difforme. Ce résultat suggère que chez *C. elegans*, comme chez les autres organismes, l'ajout de groupements lipidiques sur les HRPs est également nécessaire à leur fonction.

2.1.3 Perspectives expérimentales.

Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait savoir si *hhat-2(ARNi)* récapitule l'ensemble des phénotypes observés en cas d'inactivation d'un gène quelconque des familles *warthog*, *groundhog*, *ptc* ou *ptr*. Cela demanderait entre autre de réaliser des marquages au DiO ou Dil, d'observer la structure des cellules socle et gaine des amphides en microscopie électronique, d'identifier les stades d'arrêt embryonnaire et larvaire des vers *hhat-2(ARNi)* etc. et si possible leurs causes.

Il serait ensuite intéressant de tester si les protéines WRT-2 et WRT-8 sont correctement sécrétées si les acides aminés sur lesquels sont effectuées les modifications post-traductionnelles, sont mutés. Il s'agirait d'une part de muter les résidus N-terminaux permettant l'ajout de palmitate, et d'autre part de muter le domaine Hint et les résidus permettant l'ajout de stérol. A priori, que ce soit pour WRT-5 (Hao, Aspock et al. 2006) ou pour QUA-1 (Hao, Mukherjee et al. 2006), le domaine Hint ne serait pas essentiel, mais on ne peut pas conclure pour WRT-2 et WRT-8. Les protéines mutantes recombinantes fusionnées à la GFP permettraient d'observer leur localisation cuticulaire, apicale, basolatérale ou cytoplasmique soit par microscopie optique confocale à épifluorescence, soit par immunolocalisation à l'or colloïdal sur coupes de ME.

2.2 Transport et dispersion des HRPs.

2.2.1 Comment est réalisé le transport des protéines de type Hedgehog ?

Tout d'abord, un grand nombre de données indiquent que les modifications post-traductionnelles citées précédemment sont non seulement requises pour la sécrétion polarisée, mais aussi pour la diffusion à longue distance et la dispersion des HRPs (Porter,

Ekker et al. 1996; Chen, Li et al. 2004; Panakova, Sprong et al. 2005; Eaton 2006; Gallet, Ruel et al. 2006). La nature hydrophobe des groupements palmitoyle et cholestérol (ou probablement d'autres stérols chez le ver (Kurzchalia and Ward 2003; Merris, Wadsworth et al. 2003; Matyash, Entchev et al. 2004)), implique que pour diffuser dans le milieu extracellulaire et agir à longue distance, les HRPs doivent être associées à des structures circulantes particulières (Eaton 2006). Ces structures seraient soit des multimères de HRPs permettant de masquer les parties hydrophobe au cœur du complexe, pour exposer les structures hydrophiles (Cohen 2003; Chen, Li et al. 2004; Gallet, Ruel et al. 2006), soit des lipoprotéines (Panakova, Sprong et al. 2005), soit des vésicules sécrétées comme les argosomes (Greco, Hannus et al. 2001; Tanaka, Okada et al. 2005) ou les NVPs (« Nodal Vesicular Particles ») (Tanaka, Okada et al. 2005), ou encore des excroissances membranaires contenant des radeaux lipidiques enrichis en morphogènes et qui viendraient contacter des cellules cibles à plusieurs diamètres cellulaires du corps cellulaire de la cellule « émettrice » (Incardona, Lee et al. 2000; Hsiung, Ramirez-Weber et al. 2005). Nos données suggèrent que les HRPs chez *C. elegans* sont sécrétées via des vésicules de type exosomes (Liegeois, Benedetto et al. 2006).

La sécrétion des morphogènes comme Hedgehog et Wingless est un débat très actuel notamment parce qu'il faut comprendre maintenant comment les gradients de morphogènes sont générés et maintenus, et tant qu'on ne sait pas à quel type de particule on a à faire, il est difficile d'entrer dans les mécanismes moléculaires en jeu.

2.2.2 Rôle(s) de Dispatched/CHE-14.

Comme l'ARNi contre *hhat-2* (orthologue de Skinny-Hedgehog chez la drosophile (Chamoun, Mann et al. 2001) et de Skn chez la souris (Chen, Li et al. 2004)) donne un phénotype qui récapitule plusieurs défauts observés lorsque l'on inactive des HRPs, on peut penser que les HRPs sont acétylées chez *C. elegans*. L'acétylation et l'addition de cholestérol en C-ter favorisent l'ancre des protéines de type Hedgehog dans la membrane (Peters, Wolf et al. 2004). Cependant l'ancre stable par le cholestérol pourrait inhiber la sécrétion des HRPs, c'est une des raisons pour laquelle Dispatched/CHE-14 est supposé être requise. Cette protéine possédant un domaine senseur des stérols (SSD, « Sterol-Sensing Domain ») permettrait de trier les HRPs d'environnements lipidiques où ils seraient ancrés lors de leur adressage (Peters, Wolf et al. 2004). Un tel tri pourrait être nécessaire lors de la formation des vésicules intraluminales dans les CMVs, pour transférer les HRPs d'un environnement lipidique (la membrane externe des CMVs) à un autre (les futurs exosomes).

Chez *C. elegans*, le mutant *che-14* accumule les protéines WRT-2 et WRT-8 apicalement dans les cellules socles des amphides, des phasmides, et dans les seam (Figure 57). Ainsi, CHE-14/Dispatched, pourrait être impliqué dans la sécrétion des HRPs chez *C. elegans*.

Outre sa fonction dans la sécrétion des HRPs, CHE-14/Dispatched serait également requise pour leur action à longue distance chez la drosophile et la souris (Burke, Nellen et al. 1999; Kawakami, Kawcak et al. 2002; Ma, Erkner et al. 2002; Gallet, Rodriguez et al. 2003; Nakano, Kim et al. 2004; Tian, Tenzen et al. 2004; Tian, Jeong et al. 2005), ce qui n'est pas connu pour *C. elegans*.

Or, on vient de voir que l'action à longue distance des HRPs passeraient par des véhicules comme les lipoprotéines, les NVPs ou les exosomes (Eaton 2006). On peut donc imaginer que Dispatched/CHE-14 est impliquée dans la formation/sécrétion de ces structures, dans leur stabilité, ou encore dans l'incorporation des HRPs dans ces structures. Cette possibilité expliquerait comment une protéine transmembranaire de la cellule émettrice comme Dispatched/CHE-14 peut influencer la signalisation à longue distance, et d'autre part expliquerait comment Dispatched serait impliquée dans la sécrétion des HRPs.

Pour tenter de résoudre ces questions, on pourrait utiliser l'épiderme de *C. elegans* et la sécrétion par les exosomes comme modèle d'étude. Il s'agirait par exemple de localiser par immunomarquage à l'or colloïdal la protéine CHE-14 (à l'aide d'un anti-CHE-14 ou d'un anti-GFP dans une souche exprimant CHE-14 ::GFP), de caractériser les CMVs des mutants *che-14* (morphologie normale ? produisent-il aussi facilement des exosomes ? s'accumulent-ils ? etc.), et de localiser WRT-2 ::GFP par immunomarquage à l'or colloïdal en ME dans les mutants *che-14* (y a-t-il un défaut de localisation, d'accumulation ?).

2.3 Protéines Hedgehog (HRPs) et signalisation : qu'en est-il chez *C. elegans* ?

Parmi les autres grandes questions concernant la « signalisation Hedgehog » chez *C. elegans* on peut citer les suivantes : y a-t-il oui ou non une voie de signalisation ? Si oui, quelles sont les cellules cibles ? Les HRPs sont-elles internalisées avec ou sans leurs récepteurs ? Quelle est la voie de transduction du signal (en l'absence de Smoothened) ? Et enfin à quoi sert cette voie chez cet organisme ?

2.3.1 Rôle conservé des héparane-sulfate co-polymérases ?

Les héparane-sulfate co-polymérases participent à la synthèse de glycosaminoglycanes impliqués entre-autres dans la réception des protéines de type Hedgehog (Simmons, Musy et al. 1999; Toyoda, Kinoshita-Toyoda et al. 2000; Selleck 2001; Cohen 2003; Gallet, Rodriguez et al. 2003; Mizuguchi, Uyama et al. 2003). Cette famille comprend le gène *tout-velu* chez la drosophile, les gènes *ext-1* à *-5* chez les vertébrés, et *rib-1* et *rib-2* chez *C. elegans*.

Au cours du mini-crible ARNi que j'ai réalisé, j'ai observé que l'ARNi contre *rib-2* induit des défauts d'alae rappelant ceux des ARNi contre les HRPs ou les PTR. Ce résultat laisse ouverte la possibilité qu'à l'instar de ce qui a été démontré chez la drosophile, les héparane-sulfate co-polymérases jouent un rôle dans la « signalisation Hedgehog » chez *C. elegans*.

2.3.2 L'association HRP-récepteur pourrait être conservée chez *C. elegans*.

Différents récepteurs potentiels de HRPs existent : PTC, PTR, RIB-2 et LRP-1. Les phénotypes associés à leur perte de fonction recoupent ceux des ARNi contre les HRPs, et contre HHAT-2. Il semble donc que les fonctions des HRPs passent par leur association avec ces récepteurs.

Cependant, l'interaction directe est difficile à prouver. En effet, le domaine de liaison entre les HRPs et les récepteurs de type Patched par exemple, comprend un domaine senseur du stérol (SSD, « Sterol Sensing Domain ») et deux larges boucles lumenales ou extracellulaires, et reconnaîtrait l'extrémité C-terminale des HRP qui est associée au cholestérol. Ainsi, l'interaction serait perdue en l'absence de modifications post-traductionnelles des HRPs. Ceci exclurait donc les approches utilisant des protéines recombinantes exprimées dans des systèmes cellulaires incapables de modifier correctement les HRPs : il faut travailler directement avec des HRPs synthétisées *in vivo*.

Les HRPs sont correctement sécrétées lorsqu'elles sont associées à la GFP. Il faudrait ensuite vérifier que ces protéines de fusion sont fonctionnelles. On pourrait le faire en exprimant un transgène codant pour cette HRP-GFP dans un contexte mutant pour l'HRP concernée. Jusqu'à présent, peu de mutants de HRPs existent : *wrt-5*, *qua-1*, *wrt-8*. *qua-1* n'est peut-être pas le candidat idéal, car il semble être un élément structural de la cuticule et évacué avec la vieille cuticule. Le mutant *wrt-8* existe mais n'a pas été caractérisé et n'aurait

pas de phénotype évident (le consortium qui a généré ce mutant le décrit comme sauvage). Etant donné que *wrt-5* est déjà publié, il devrait être plus aisément de travailler avec ce mutant.

Si l'une des constructions *wrt-5 ::gfp* était capable de sauver le mutant *wrt-5*, deux types d'approches seraient envisageables.

1) Il s'agirait de réaliser le même type de construction avec différentes étiquettes à la place de la GFP, par exemple en introduisant une GST ; puis de purifier assez de cette protéine à partir d'extraits de vers. En ayant fait faire par ailleurs des anticorps contre différents récepteurs putatifs de WRT-5 (bien choisis d'après les phénotypes donnés par les ARNi de ces récepteurs, comparé à *wrt-5*), on pourrait réaliser des co-immunoprecipitations pour tester l'interaction physique des deux types de protéines

2) Une autre alternative, serait de réaliser des rapporteurs HRP et PTC/PTR pour du FRET (« Fluorescence by Resonance Energy Transfer ») et d'observer *in vivo* l'apparition de FRET entre une HRP donnée et un récepteur PTR ou PTC.

Cependant, ces stratégies nécessitent d'avoir une idée préalable des récepteurs susceptibles d'interagir avec WRT-5. En effet avec plus de 60 récepteurs potentiels, s'il fallait tous les tester, cela pourrait prendre beaucoup de temps. Un moyen de restreindre ce nombre serait de se limiter aux récepteurs co-exprimés temporellement.

2.3.3 Etudier les patrons d'expression spatio-temporelle des HRPs et de leurs récepteurs.

Avant de poser d'aborder le problème de façon plus approfondie, une meilleure caractérisation de l'expression des différents protagonistes est requise. Pour cela, il faudrait générer des rapporteurs transcriptionnels, et étudier leur expression au cours du temps dans les différents tissus concernés, et conjointement : c'est-à-dire à l'aide de lignées double- ou triple-transgéniques. L'un des résultats attendu, c'est que la plupart de ces gènes devraient avoir une expression cyclique coordonnée avec les mues, comme pour *qua-1*. D'autre part, on peut s'attendre à ce que certains gènes soient co-exprimés, d'autres non, et que par exemple un récepteur et une HRP soient co-exprimés temporellement mais dans des tissus différents, etc.

2.3.4 Les HRPs agissent-elles de façon « cellule-autonome » ?

Avant d'étudier un processus avec l'idée d'une cellule émettrice et d'une cellule cible, il faudrait savoir si l'action des HRP s se fait sur des cellules qui produisent elles-mêmes ces HRP s ou non. Un moyen classique de tester ces questions est le recours à des études de mosaïcisme. Il s'agirait de co-exprimer un marqueur nucléaire et la construction *wrt-5::gfp* dans des mutants *wrt-5* et d'observer si des défauts sont associés aux cellules qui n'expriment pas les transgènes (chez *C. elegans* la transgénèse produit des assemblages extrachromosomiques qui ne sont pas nécessairement transmis à toutes les cellules). Le marqueur WRT-5 ::GFP permettrait en même temps de voir si effectivement la protéine transgénique se retrouve à la membrane des cellules qui ne l'exprime pas ou y est internalisée.

Si en outre on dispose déjà d'un mutant d'un récepteur PTR-X spécifique de WRT-5, l'étude de mosaïcisme proposée ci-dessus, peut-être conduite chez le double mutant *ptr-x; wrt-5* exprimant de façon mosaïque un transgène fonctionnel *ptr-x::rfp* (il y a de fortes chances qu'un tel transgène soit fonctionnel, étant donné que c'est le cas pour les *che-14::xfp* et que CHE-14 est de la même famille que les PTR, PTC). L'intérêt serait ici de montrer que pour que la cellule-cible du signal WRT-5 ne présente pas de défauts, il faut que WRT-5 se trouve associé à sa membrane apicale et que cette cellule exprime elle-même le récepteur PTR-X. Grâce au mosaïcisme, on devrait en effet avoir des cas de cellules qui n'expriment pas PTR-X et qui, bien qu'étant atteintes par le signal WRT-5, présentent des défauts.

2.3.5 Existe-t-il une voie de transduction d'un signal de type Hedgehog chez *C. elegans* ?

Mettre en évidence une transduction du signal passe par la découverte d'autres protagonistes de la voie, en aval des récepteurs. L'échec de l'approche bioinformatique en raison de l'absence apparente de conservation de cette partie de la voie avec les autres organismes, conduit à envisager d'autres stratégies. L'approche à laquelle je pense plus particulièrement consisterait à rechercher des interactions physiques (par double-hybride) avec les domaines cytoplasmiques des PTRs. Ces interactions pourraient être confirmées ensuite par d'autres méthodes (CoIP, GST-pull down), puis testées génétiquement (mutants, ARNi, études d'épistasie). En revanche, je ne privilégierais pas une approche par cible ARNi à large échelle car cela risquerait de générer trop de candidats. Cela dit si l'optique à terme est d'identifier tous les gènes impliqués, on peut envisager tout de même cette approche qui serait ensuite complétée par des études d'interactions physiques entre tous les candidats positifs du cible ARNi, par exemple.

2.3.6 A quoi sert la relation HRPs / PTRs ?

Voilà une des questions que je me pose depuis longtemps et que je n'ai pas eu le temps de vraiment étudier. Si l'on récapitule les défauts les plus sévères que l'on puisse obtenir en mutant différents éléments de la voie Hedgehog chez *C. elegans*, on observe une stérilité, (souvent liée à un défaut de cytokinèse), une létalité embryonnaire précoce (liée à des défauts de cytokinèse ou d'endocytose), des défauts de mue, des défauts de morphologie cellulaire (épiderme, pharynx, gonade, vulve, rectum, cellules support des organes chimiosensoriels), des défauts de sécrétion (de la cuticule, de la matrice extracellulaire), des défauts d'osmorégulation.

2.3.6.1 Quelques pistes de réflexion.

Les phénotypes observés peuvent découler de défauts de structures membranaires cellulaires ou de la matrice extracellulaire dans différents processus : cytokinèse (PTC-1), formation des exosomes (HRPs, CHE-14 ?), mise en place de domaines membranaires de signalisation (LRP-1, RIB-2, PTR, PTC), morphogenèse apicale (WRT-5), morphogenèse du canal excréteur (CHE-14), régulation de l'ancrage cuticulaire (QUA-1, LRP-1), morphogenèse cuticulaire (la plupart des HRPs et PTRs). Ces observations peuvent suggérer que les HRPs sont impliqués dans l'organisation de structures membranaires ou d'association de la matrice extracellulaire et de la membrane plasmique.

Le mode de formation des exosomes, semble un très bon moyen de générer un tri lipidoprotéique drastique pour former des particules dotées de caractéristiques particulières (cf. 2.3.4.2 et 2.3.4.3). L'idée que les HRPs seraient sécrétés via des exosomes ouvre ainsi la possibilité que ceux-ci soient récupérés à la membrane cellulaire cible pour former des domaines membranaires dotés de propriétés particulières, comme les structures apicales ponctuées observées dans les disques imaginaux de la drosophile (Gallet, Ruel et al. 2006). Chez la drosophile, ces structures seraient requises seulement pour l'activation de certaines cibles de Hedgehog (Gallet, Rodriguez et al. 2003) et ne dépendraient pas d'une internalisation par les PTRs/PTCs (Gallet and Therond 2005). L'internalisation par les PTRs/PTCs dans des compartiments de dégradation lysosomaux enrichis en Rab7 servirait en réalité à former le gradient de Hedgehog (Gallet and Therond 2005). La propagation des structures ponctuées contenant Hedgehog serait elle dépendante des héparane-sulfate protéoglycans (Gallet, Rodriguez et al. 2003).

On peut donc imaginer que chez *C. elegans* les mêmes types de processus interviennent. Les exosomes seraient propagés via les héparane-sulfate protéoglycanes et formeraient des domaines membranaires particuliers à la surface apicale des cellules cibles (appelons les « domaines HRPs »), et dans les cellules où ils sont exprimés les PTRs/PTCs réguleraient la formation et la propagation de ces domaines membranaires. Les domaines HRPs pourraient éventuellement servir de système d'ancrage à la matrice extracellulaire ou de plateformes d'adressage apicales pour la sécrétion, sans nécessairement faire intervenir de voie de transduction, ce qui serait en accord avec l'absence de Smo et de la plupart des acteurs de la transduction du signal Hedgehog chez *C. elegans*.

Un rôle des PTRs/PTCs dans la définition des domaines HRPs au niveau de la membrane apicale épidermique pourrait expliquer les défauts de forme des alae des deux types d'ARNi (contre les HRPs et contre les PTRs).

Il resterait à voir si on peut mettre en évidence de tels domaines (QUA-1 présente déjà un patron de localisation particulier (Hao, Mukherjee et al. 2006)) grâce à des rapporteurs XFPs pour différents PTRs et HRPs. Le fait que l'épiderme du ver est syncitial apporterait cependant une complication au modèle dans la mesure où la cellule émettrice est aussi probablement réceptrice, et qu'il faudrait invoquer une partition de la membrane apicale en domaines PTRs et domaines HRPs. Parmi les éléments impliqués dans cette partition, peut-être que les seam sont impliquées, et d'autre part, le cytosquelette, avec notamment les organites fibreux où QUA-1 est détectée au niveau de la zone de contact muscle-épiderme (Hao, Mukherjee et al. 2006).

2.3.6.2 Une autre « théorie ».

Shai Shaham dont l'équipe a cloné le gène et caractérisé les mutants *daf-6* (Perens and Shaham 2005) propose que la fonction commune ancestrale des protéines de type Patched serait l'inhibition de certains évènements d'endocytose. Les protéines de type Hedgehog auraient en fait la capacité d'inhiber cette activité en se fixant au récepteur Patched. Cela permettrait d'expliquer l'absence de voie de transduction découverte à ce jour. Cette hypothèse repose sur l'observation que *daf-6* et *che-14* sont synergiques dans les cellules qu'il appelle gliales (cellules supports des amphides), que la surexpression de l'un dans le mutant nul pour l'autre ne permet aucun sauvetage, et que *che-14* est impliqué dans l'exocytose.

Cela ne prend apparemment pas en compte les données sur les PTRs et les HRPs. Notamment, s'il fallait raisonner selon son modèle tout en considérant qu'un lien PTRs/HRPs est conservé chez *C. elegans*, il faudrait imaginer que la relation serait inversée par rapport aux autres modèles, à savoir que les PTCs/PTRs empêcheraient l'endocytose des HRPs ?

Les HRP_s pourraient être aussi endocytés par LRP-1 (Yochem, Tuck et al. 1999; Roggo, Bernard et al. 2002; Fisher and Howie 2006). Dans ce cas peut-être que les PTRs/PTCs serviraient à séquestrer les HRP_s pour prévenir leur endocytose via LRP-1 ? Alors comment des ARNi contre des PTRs (Zugasti, Rajan et al. 2005) pourraient donner le même type de phénotype (défaut de mue par exemple) que le mutant *Irp-1* (Yochem, Tuck et al. 1999) ?

Pour l'instant je ne comprends pas le modèle proposé par Mr. Shaham.

3 Pourquoi une sécrétion apicale d'exosomes chez *C. elegans* ?

3.1 Quelle est la nature des CMVs ?

3.1.1 Les différents CMVs.

3.1.1.1 Dans quels tissus sont-ils observés ?

Samuel et moi avons trouvé des CMVs principalement dans les cellules de l'épiderme majeur : seam et hyp7, mais aussi dans le canal excréteur, bien que ceux-ci semblent d'un autre type. Les CMVs ne sont pas extrêmement fréquents (on n'en trouve pas sur toutes les coupes) et il existe probablement une relation entre le stade de l'animal et le nombre de CMVs. De fait, nous n'avons pas observé les autres tissus à la recherche de ces organites, si bien que je peux seulement dire que dans les autres organes, les CMVs éventuels ne nous ont pas sautés aux yeux. Il serait pourtant intéressant de savoir si ces structures sont présentes dans tous les tissus et si elles se ressemblent. Au niveau de l'épiderme en tout cas, les CMVs sont présents dans hyp7 (où VHA-5 s'exprime) et dans les seam (où VHA-5 n'est pas exprimé, les CMVs sont-ils sécrétoires aussi ? une autre sous-unité « a » prend elle le relais ?).

3.1.1.2 CMVs clairs (CMVCs).

Lors de notre investigation des corps multivésiculaires, Samuel et moi avons observé deux types de CMVs, que nous avons baptisés CMVs clairs (CMVCs) et denses (CMVDs), d'après leur aspect en microscopie électronique. Les CMVs clairs sont plus petits, d'une taille variant entre 200 et 400 nm, les plus petits étant peu denses en vésicules.

Ils présentent des enrichissements en clathrine (zones denses aux électrons à la membrane externe des CMVs) au niveau où se forment les nouvelles vésicules intraluminales comme ce qui a été décrit pour les endosomes multivésiculaires ou lysosomes sécrétoires des lymphocytes B et des cellules dendritiques (Murk, Humbel et al. 2003).

Nous avons montré que ces CMVCs se trouvent enrichis sous la membrane apicale, avec laquelle il peuvent fusionner pour sécréter leurs vésicules internes qui constituent alors des exosomes libres dans la cuticule basale.

3.1.1.3 CMVs denses (CMVDs).

Les CMVDs sont plus denses aux électrons certainement en partie parce qu'ils sont plus denses en vésicules. Ils sont généralement plus gros que les CMVCs (entre 300 nm et plus de 1 µm) et sont trouvés quelques fois à proximité de la membrane apicale mais la plus part du temps au milieu du cytoplasme. Nous n'avons jamais observé de fusion d'un de ces CMVDs avec la membrane plasmique. Il est probable que ces organites correspondent aux endosomes tardifs.

3.1.1.4 Les compartiments hybrides CMVDs-lysosomes.

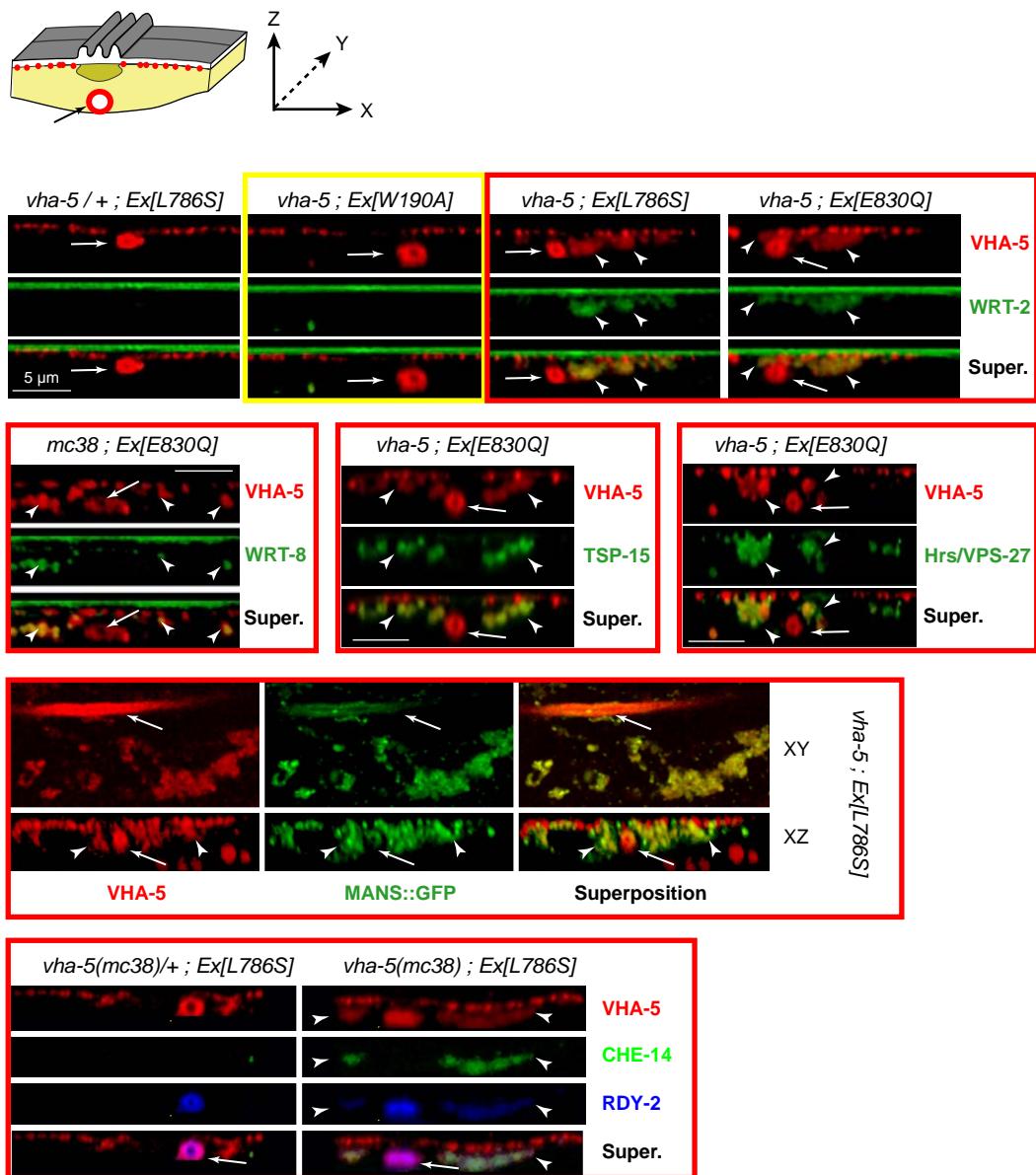
Un argument en faveur de la nature endosomale « tardive » des CMVDs, est leur capacité à fusionner avec les lysosomes pour former des compartiments hybrides multivésiculaires denses et multilamellaires atteignant plusieurs microns, comme observé dans d'autres systèmes (Bright, Reaves et al. 1997; Mullock, Bright et al. 1998; Luzio, Mullock et al. 2001; Luzio, Pryor et al. 2005). Ces compartiments s'accumulent de façon périnucléaire et ne fusionnent pas non plus avec la membrane apicale, mais semblent évoluer en lysosomes comme déjà décrit (cf. Figure 27).

3.1.2 Composition des CMVs.

Jusqu'à présent, j'ai pu montrer par immunomarquage à l'or colloïdal que VHA-5 et WRT-2 étaient localisés au niveau des CMVCs et CMVDs et dans leurs vésicules intraluminales. Par microscopie optique confocale à épifluorescence, j'ai pu également montrer qu'un certain nombre de protéines s'accumulent avec VHA-5, très probablement au niveau des CMVCs, CMVDs et organites hybrides, dans l'épiderme des mutants « cuticule de *C. elegans* ». Ces protéines sont HRS/VPS-27 (Roudier, Lefebvre et al. 2005), la tétraspanine TSP-15 (Moribe, Yochem et al. 2004) (Figure 69), la « tétraspanine-like » RDY-2 (Article 1), CHE-14 (Artcicle 1), les HRPs WRT-2 et WRT-8 (Article 2), et le marqueur du Golgi MANS (pour « mannosidase-short ») (Rolls, Hall et al. 2002), Figure 69).

La présence de protéines de type tétraspanines est caractéristique des exosomes (Thery, Zitvogel et al. 2002; Mallegol, van Niel et al. 2005), celle des HRPs WRT-2 et WRT-8

Figure 69. PROTEINES ACCUMULEES DANS LES CMVs CHEZ LES MUTANTS "CUTICULE" DE VHA-5.



LEGENDE.

Les mutants "cuticule" de *vha-5* accumulent dans l'épiderme VHA-5, WRT-2, WRT-8, TSP-15, VPS-27, MANS, CHE-14 et RDY-2 (têtes de flèches). Le canal excréteur est indiqué par des flèches blanches..

renvoie à l'observation des NVPs contenant Sonic-Hedgehog (Tanaka, Okada et al. 2005), celle de VPS-27 indique probablement une connection avec les endosomes précoce (Roudier, Lefebvre et al. 2005), et celle du marqueur MANS une connection avec la voie biosynthétique.

3.1.3 Formation de ces CMVs ?

D'après les marqueurs que j'ai pu localiser a priori dans les CMVs, ceux-ci se trouvent à l'intersection entre voie biosynthétique, exocytose et endocytose. On pourrait imaginer que less CMVs se forment donc à partir des endosomes précoce et en étant alimentés par la voie biosynthétique en protéines à sécréter (Figure 70). Pour élucider un peu mieux le trafic au niveau de ces CMVs, il faudrait localiser les marqueurs GFP testés par immunomarquage à l'or colloïdal en MET, et observer leur répartition entre les différents types de compartiments. Il faudrait par ailleurs tester d'autres marqueurs. Dans ce but, j'ai ainsi cloné sous promoteur *vha-8*, les transgènes *rab-5 ::gfp*, *rme-8 ::gfp*, *rab-7 ::gfp*, et Satis Sookhareea m'a cloné *rab-4 ::gfp* et *rab-11 ::gfp*.

3.2 Rôles des Exosomes.

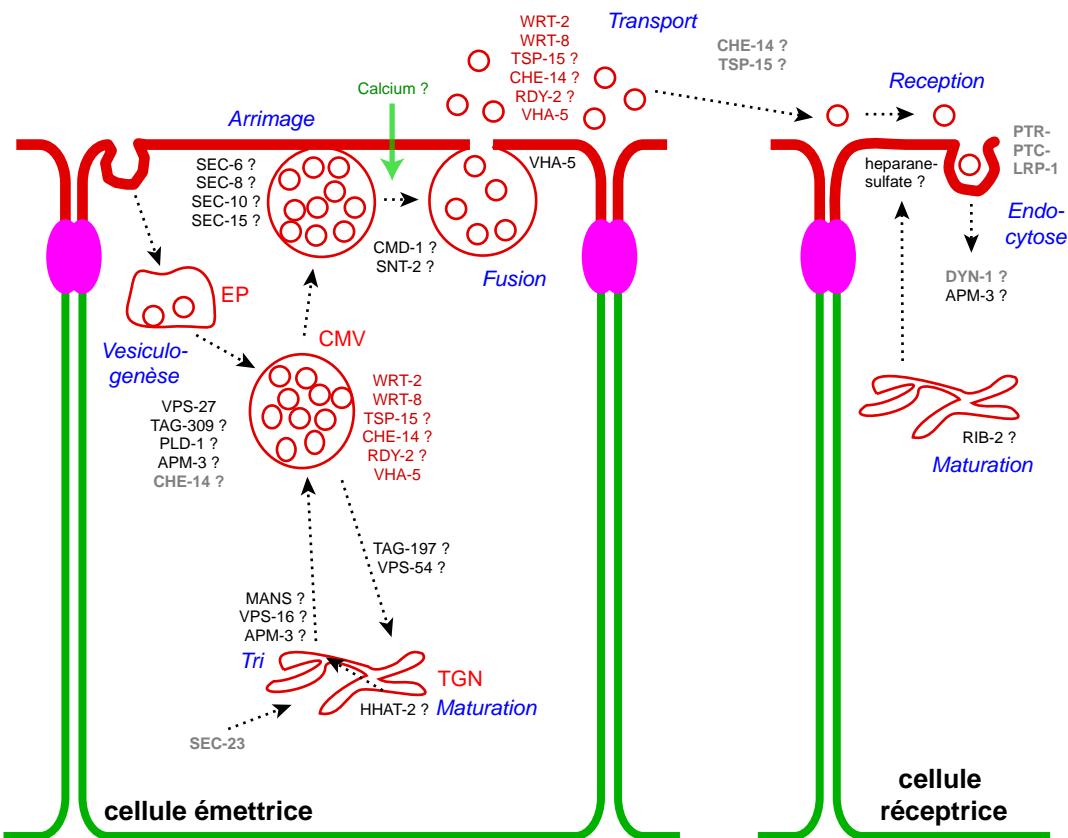
L'essentiel de ce que j'évoque ici est hautement spéculatif car je ne dispose que de peu de données et de recul sur les exosomes dans le modèle *C. elegans*. Néanmoins il m'a semblé incontournable d'en parler.

3.2.1 Exosomes et biogenèse de la cuticule.

3.2.1.1 Composants protéiques.

QUA-1 semble être un constituant de la cuticule et les exosomes contenant WRT-2 et WRT-8 sont sécrétés dans la cuticule basale. On peut donc penser que les exosomes serviraient à sécréter des composants mineurs de la cuticule comme certaines HRPs à destination cuticulaire. Par ailleurs, il est peu probable que les métalloprotéinases soient sécrétées par la même voie que les collagènes. Il est possible qu'elles empruntent la même voie de sécrétion par les CMVs que les HRPs. J'ai ainsi prévu depuis quelque temps de tester la sécrétion de NAS-37 (Davis, Birnie et al. 2004) dans les mutants « cuticule » de *vha-5*, pour vérifier si cette métalloprotéinase s'y accumule (je dispose pour cela du

Figure 70. MODELE RECAPITULATIF PRENANT EN COMPTE L'ENSEMBLE DES RESULTATS



LEGENDE.

Schéma tentant de remplacer les différentes protéines potentiellement impliquées dans le processus de sécrétion/signification par les CMVs et leurs exosomes, en se basant sur les résultats publiés et obtenus par ailleurs au cours de ma thèse (crible ARNi, tests indépendants de différents marqueurs GFP). Les résultats antécédents à mon travail sont indiqués en gris gras.

Je n'ai pas indiqué d'identité précise pour les compartiments multivésiculaires (CMV) car les quelques marqueurs que j'ai étudié ne permettent pas de conclure quant-à la nature de ceux-là. EP : endosomes précoce, TGN : trans-Golgi.

transgène *nas-37 ::gfp*). Il aurait été intéressant de tester également les cuticulines (Muriel, Brannan et al. 2003; Sapiro, Hilliard et al. 2005).

3.2.1.2 Composants lipidiques.

La cuticule de *C. elegans* comporte une fraction lipidique qui participe à son étanchéité (Figure 42D). La sécrétion de ces lipides n'est pas connue. D'autre part, les CMVCs vus en microscopie électronique à transmission après cryofixation à haute pression, sont souvent associés à des gouttelettes lipidiques qui sont très abondantes dans l'épiderme (Figure 71). Peut-être que ces lipides sont impliqués dans l'alimentation des CMVs pour la formation des vésicules intraluminales, et que les exosomes transportent ainsi des lipides destinés à la cuticule ?

3.2.2 Un rôle des exosomes dans l'immunité innée ?

Un rôle de présentation d'antigènes est pour l'instant très hypothétique chez *C. elegans*. L'investigation de l'immunité innée chez *C. elegans* commence tout juste à mettre à jour quelques facteurs protéiques impliqués (Mallo, Kurz et al. 2002; Couillaud, Pujol et al. 2004).

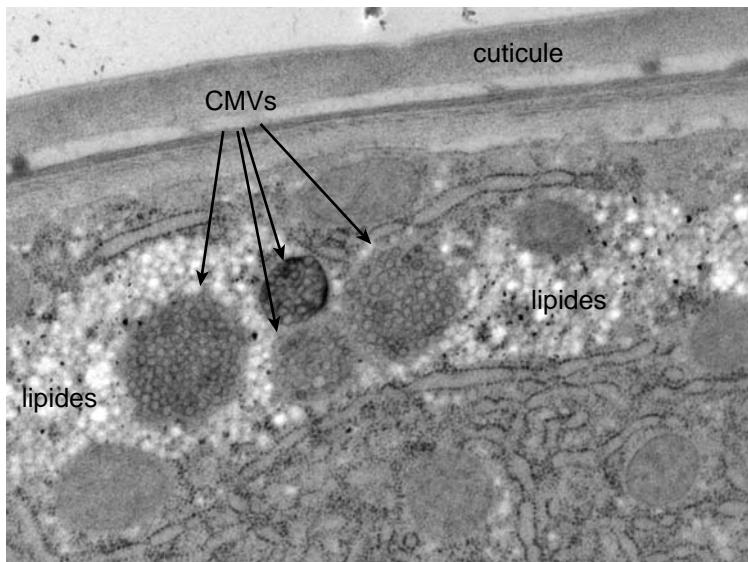
Le fait que les exosomes transportent des peptides antimicrobiens est peut-être plus probable et plus aisément testable comme je l'ai évoqué au point 3.2.4.2.

3.2.3 Un rôle développemental des exosomes ?

Cette question rejoint ce que j'ai évoqué lors du point 2.3.6. Si effectivement les HRPs ont un rôle développemental, par exemple lors de l'établissement de la polarité cellulaire via leur participation à des domaines membranaires apicaux, ou via l'organisation et l'ancrage de la matrice extracellulaire, il est possible que les exosomes chez *C. elegans* jouent un rôle développemental comme les argosomes chez la drosophile (Greco, Hannus et al. 2001) et les NVPs chez la souris (Tanaka, Okada et al. 2005). D'autre part les exosomes transportent potentiellement d'autres protéines qui pourraient avoir un rôle développemental.

Chez les mutants « cuticule » et « mixte » de *vha-5*, on observe ainsi une croissance ralentie dépendante de la température (les mutants « cuticule » ne se développent presque plus à 15°C) et corrélée à l'intensité du phénotype Dpy. D'autre part, leur phénotype Dpy médian ne suffit pas à expliquer la différence de taille (57% de celle d'un sauvage pour

Figure 71. CMVS DANS DES GOUTELETTES LIPIDIQUES DE L'EPIDERME HYP7



LEGENDE.

Les corps multivésiculaires sont fréquemment trouvé dans des environnements riches en lipides dans l'épiderme adulte de *C. elegans*.

V844F) entre les mutants « cuticule » (L786S, E830Q et V844F) ou « mixte » (W327A) et les autres (sauvage N2, W190A, R191A) (cf. Article 2). Il n'est donc pas exclu qu'un processus de croissance soit inhibé lorsque la sécrétion d'exosomes est perturbée chez *C. elegans*.

BIBLIOGRAPHIE :

- (1998). "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology." *Science* **282**(5396): 2012-8.
- Adams, D. S., K. R. Robinson, et al. (2006). "Early, H+-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates." *Development* **133**(9): 1657-71.
- Advani, R. J., B. Yang, et al. (1999). "VAMP-7 mediates vesicular transport from endosomes to lysosomes." *J Cell Biol* **146**(4): 765-76.
- Agarraberres, F. A. and J. F. Dice (2001). "A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation." *J Cell Sci* **114**(Pt 13): 2491-9.
- Aguinaldo, A. M., J. M. Turbeville, et al. (1997). "Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals." *Nature* **387**(6632): 489-93.
- Ahearn, G. A., P. K. Mandal, et al. (2004). "Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review." *J Comp Physiol [B]* **174**(6): 439-52.
- Ait Slimane, T. and D. Hoekstra (2002). "Sphingolipid trafficking and protein sorting in epithelial cells." *FEBS Lett* **529**(1): 54-9.
- Alberts, P., R. Rudge, et al. (2006). "Cdc42 and actin control polarized expression of TI-VAMP vesicles to neuronal growth cones and their fusion with the plasma membrane." *Mol Biol Cell* **17**(3): 1194-203.
- Alfallah, M., R. Jacob, et al. (1999). "O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts." *Curr Biol* **9**(11): 593-6.
- Allan, B. B., B. D. Moyer, et al. (2000). "Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion." *Science* **289**(5478): 444-8.
- Allen, R. D. (2000). "The contractile vacuole and its membrane dynamics." *Bioessays* **22**(11): 1035-42.
- Allen, R. D. and A. K. Fok (2000). "Membrane trafficking and processing in Paramecium." *Int Rev Cytol* **198**: 277-318.
- Allen, R. D., L. Ma, et al. (1993). "Acidosomes: recipients of multiple sources of membrane and cargo during development and maturation." *J Cell Sci* **106** (Pt 1): 411-22.
- Allen, R. D. and Y. Naitoh (2002). "Osmoregulation and contractile vacuoles of protozoa." *Int Rev Cytol* **215**: 351-94.
- Almers, W. and F. W. Tse (1990). "Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis?" *Neuron* **4**(6): 813-8.
- Alper, S. L. (2002). "Genetic diseases of acid-base transporters." *Annu Rev Physiol* **64**: 899-923.
- Altschuler, Y., C. Hodson, et al. (2003). "The apical compartment: trafficking pathways, regulators and scaffolding proteins." *Curr Opin Cell Biol* **15**(4): 423-9.
- Altschuler, Y., S. Liu, et al. (1999). "ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells." *J Cell Biol* **147**(1): 7-12.
- Ambros, V. (1989). "A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*." *Cell* **57**(1): 49-57.
- Anderson, D. C., S. C. King, et al. (1982). "Proton gradient linkage to active uptake of [³H]acetylcholine by Torpedo electric organ synaptic vesicles." *Biochemistry* **21**(13): 3037-43.
- Andrews, N. W. and S. Chakrabarti (2005). "There's more to life than neurotransmission: the regulation of exocytosis by synaptotagmin VII." *Trends Cell Biol* **15**(11): 626-31.
- Ang, A. L., H. Folsch, et al. (2003). "The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells." *J Cell Biol* **163**(2): 339-50.
- Antonin, W., C. Holroyd, et al. (2000). "A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function." *Embo J* **19**(23): 6453-64.
- Antonin, W., C. Holroyd, et al. (2000). "The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes." *Mol Biol Cell* **11**(10): 3289-98.
- Antony, B. (2006). "Membrane deformation by protein coats." *Curr Opin Cell Biol* **18**(4): 386-94.
- Antony, B., S. Beraud-Dufour, et al. (1997). "N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange." *Biochemistry* **36**(15): 4675-84.
- Apodaca, G., L. A. Katz, et al. (1994). "Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes." *J Cell Biol* **125**(1): 67-86.
- Apps, D. K., J. G. Pryde, et al. (1980). "Both the transmembrane pH gradient and the membrane potential are important in the accumulation of amines by resealed chromaffin-granule 'ghosts'." *FEBS Lett* **111**(2): 386-90.
- Apps, D. K., J. G. Pryde, et al. (1980). "Inhibition of adenosine triphosphatase, 5-hydroxytryptamine transport and proton-translocation activities of resealed chromaffin-granule 'ghosts'." *Biochem J* **190**(2): 273-82.
- Arai, H., G. Terres, et al. (1988). "Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump." *J Biol Chem* **263**(18): 8796-802.
- Arata, Y., J. D. Baleja, et al. (2002). "Localization of subunits D, E, and G in the yeast V-ATPase complex using cysteine-mediated cross-linking to subunit B." *Biochemistry* **41**(37): 11301-7.
- Arata, Y., T. Nishi, et al. (2002). "Structure, subunit function and regulation of the coated vesicle and yeast vacuolar (H⁺)-ATPases." *Biochim Biophys Acta* **1555**(1-3): 71-4.
- Aravanis, A. M., J. L. Pyle, et al. (2003). "Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity." *Nature* **423**(6940): 643-7.
- Archer, D. A., M. E. Graham, et al. (2002). "Complexin regulates the closure of the fusion pore during regulated vesicle exocytosis." *J Biol Chem* **277**(21): 18249-52.
- Artalejo, C. R., A. Elhamdani, et al. (1998). "Secretion: dense-core vesicles can kiss-and-run too." *Curr Biol* **8**(2): R62-5.
- Aspock, G., H. Kagoshima, et al. (1999). "*Caenorhabditis elegans* has scores of hedgehog-related genes: sequence and expression analysis." *Genome Res* **9**(10): 909-23.
- Aviezer-Hagai, K., V. Padler-Karavani, et al. (2003). "Biochemical support for the V-ATPase rotary mechanism: antibody against HA-tagged Vma7p or Vma16p but not Vma10p inhibits activity." *J Exp Biol* **206**(Pt 18): 3227-37.
- Babst, M. (2005). "A protein's final ESCRT." *Traffic* **6**(1): 2-9.
- Babst, M., D. J. Katzmann, et al. (2002). "Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body." *Dev Cell* **3**(2): 283-9.

- Bache, K. G., A. Brech, et al. (2003). "Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes." *J Cell Biol* **162**(3): 435-42.
- Bachhawat, A. K., M. F. Manolson, et al. (1993). "The VPH2 gene encodes a 25 kDa protein required for activity of the yeast vacuolar H(+)-ATPase." *Yeast* **9**(2): 175-84.
- Bageshwar, U. K., S. Taneja-Bageshwar, et al. (2005). "Two isoforms of the A subunit of the vacuolar H(+)-ATPase in *Lycopersicon esculentum*: highly similar proteins but divergent patterns of tissue localization." *Planta* **220**(4): 632-43.
- Balch, W. E. (1990). "Small GTP-binding proteins in vesicular transport." *Trends Biochem Sci* **15**(12): 473-7.
- Baldini, G., A. M. Martelli, et al. (2005). "Rabphilin localizes with the cell actin cytoskeleton and stimulates association of granules with F-actin cross-linked by $\{\alpha\}$ -actinin." *J Biol Chem* **280**(41): 34974-84.
- Balin, B. J. and R. D. Broadwell (1988). "Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. I. Choroid plexus and the blood-cerebrospinal fluid barrier." *J Neurocytol* **17**(6): 809-26.
- Bankers-Fulbright, J. L., G. M. Kephart, et al. (2004). "Platelet-activating factor stimulates cytoplasmic alkalinization and granule acidification in human eosinophils." *J Cell Sci* **117**(Pt 24): 5749-57.
- Baram, D., R. Adachi, et al. (1999). "Synaptotagmin II negatively regulates Ca²⁺-triggered exocytosis of lysosomes in mast cells." *J Exp Med* **189**(10): 1649-58.
- Baram, D., M. Linial, et al. (1998). "Ca²⁺-dependent exocytosis in mast cells is stimulated by the Ca²⁺ sensor, synaptotagmin I." *J Immunol* **161**(10): 5120-3.
- Bard, F. and V. Malhotra (2006). "The Formation of TGN-to-Plasma-Membrane Transport Carriers." *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Barenholz, Y. (2004). "Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications." *Subcell Biochem* **37**: 167-215.
- Barlowe, C. (1997). "Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic proteins." *J Cell Biol* **139**(5): 1097-108.
- Barr, F. A. and J. Shorter (2000). "Membrane traffic: do cones mark sites of fission?" *Curr Biol* **10**(4): R141-4.
- Barral, J. M., S. A. Broadley, et al. (2004). "Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases." *Semin Cell Dev Biol* **15**(1): 17-29.
- Barrowman, J., M. Sacher, et al. (2000). "TRAPP stably associates with the Golgi and is required for vesicle docking." *Embo J* **19**(5): 862-9.
- Basanez, G. (2002). "Membrane fusion: the process and its energy suppliers." *Cell Mol Life Sci* **59**(9): 1478-90.
- Batenburg, J. J. (1992). "Surfactant phospholipids: synthesis and storage." *Am J Physiol* **262**(4 Pt 1): L367-85.
- Baumert, M., P. R. Maycox, et al. (1989). "Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain." *Embo J* **8**(2): 379-84.
- Bayer, M. J., C. Reese, et al. (2003). "Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca²⁺-releasing channel." *J Cell Biol* **162**(2): 211-22.
- Beaulieu, V., N. Da Silva, et al. (2005). "Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H+-ATPase recycling." *J Biol Chem* **280**(9): 8452-63.
- Becker, K. A. and N. H. Hart (1999). "Reorganization of filamentous actin and myosin-II in zebrafish eggs correlates temporally and spatially with cortical granule exocytosis." *J Cell Sci* **112** (Pt 1): 97-110.
- Beisson, J., M. Lefort-Tran, et al. (1976). "Genetic analysis of membrane differentiation in Paramecium. Freeze-fracture study of the trichocyst cycle in wild-type and mutant strains." *J Cell Biol* **69**(1): 126-43.
- Bement, W. M., H. Benink, et al. (2000). "Evidence for direct membrane retrieval following cortical granule exocytosis in *Xenopus* oocytes and eggs." *J Exp Zool* **286**(7): 767-75.
- Ben-Tekaya, H., K. Miura, et al. (2005). "Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC." *J Cell Sci* **118**(Pt 2): 357-67.
- Benli, M., F. Doring, et al. (1996). "Two GTPase isoforms, Ypt31p and Ypt32p, are essential for Golgi function in yeast." *Embo J* **15**(23): 6460-75.
- Bennett, M. K. (1995). "SNAREs and the specificity of transport vesicle targeting." *Curr Opin Cell Biol* **7**(4): 581-6.
- Bennett, M. K., N. Calakos, et al. (1992). "Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones." *Science* **257**(5067): 255-9.
- Benting, J. H., A. G. Rietveld, et al. (1999). "N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells." *J Cell Biol* **146**(2): 313-20.
- Bentivoglio, M. (1999). "The discovery of the Golgi apparatus." *J Hist Neurosci* **8**(2): 202-8.
- Beronja, S., P. Laprise, et al. (2005). "Essential function of *Drosophila* Sec6 in apical exocytosis of epithelial photoreceptor cells." *J Cell Biol* **169**(4): 635-46.
- Berry, K. L., H. E. Bulow, et al. (2003). "A *C. elegans* CLIC-like protein required for intracellular tube formation and maintenance." *Science* **302**(5653): 2134-7.
- Bi, X., R. A. Corpina, et al. (2002). "Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat." *Nature* **419**(6904): 271-7.
- Bidani, A., B. S. Reisner, et al. (2000). "Bactericidal activity of alveolar macrophages is suppressed by V-ATPase inhibition." *Lung* **178**(2): 91-104.
- Bielli, A., C. J. Haney, et al. (2005). "Regulation of Sar1 NH₂ terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission." *J Cell Biol* **171**(6): 919-24.
- Bielli, A., P. O. Thornqvist, et al. (2001). "The small GTPase Rab4A interacts with the central region of cytoplasmic dynein light intermediate chain-1." *Biochem Biophys Res Commun* **281**(5): 1141-53.
- Bigay, J., J. F. Casella, et al. (2005). "ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif." *Embo J* **24**(13): 2244-53.
- Birman, S., M. Israel, et al. (1986). "Solubilization and partial purification of a presynaptic membrane protein ensuring calcium-dependent acetylcholine release from proteoliposomes." *J Neurochem* **47**(2): 433-44.
- Birman, S., F. M. Meunier, et al. (1990). "A 15 kDa proteolipid found in mediatophore preparations from Torpedo electric organ presents high sequence homology with the bovine chromaffin granule protonophore." *FEBS Lett* **261**(2): 303-6.
- Bishop, N., A. Horman, et al. (2002). "Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates." *J Cell Biol* **157**(1): 91-101.
- Blaxter, M. L. (1993). "Cuticle surface proteins of wild type and mutant *Caenorhabditis elegans*." *J Biol Chem* **268**(9): 6600-9.
- Blobel, G. (1980). "Intracellular protein topogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(3): 1496-500.
- Bblobel, G. and B. Dobberstein (1975). "Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma." *J Cell Biol* **67**(3): 835-51.
- Blobel, G. and B. Dobberstein (1975). "Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components." *J Cell Biol* **67**(3): 852-62.

- Block, M. R., B. S. Glick, et al. (1988). "Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21): 7852-6.
- Blott, E. J., G. Bossi, et al. (2001). "Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail." *J Cell Sci* **114**(Pt 13): 2405-16.
- Blott, E. J. and G. M. Griffiths (2002). "Secretory lysosomes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(2): 122-31.
- Bock, J. B., H. T. Matern, et al. (2001). "A genomic perspective on membrane compartment organization." *Nature* **409**(6822): 839-41.
- Boekema, E. J., T. Ubbink-Kok, et al. (1997). "Visualization of a peripheral stalk in V-type ATPase: evidence for the stator structure essential to rotational catalysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14291-3.
- Boesch, S. T., B. Eller, et al. (2003). "Expression of two isoforms of the vacuolar-type ATPase subunit B in the zebrafish Danio rerio." *J Exp Biol* **206**(Pt 11): 1907-15.
- Bonifacino, J. S. and L. M. Traub (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." *Annu Rev Biochem* **72**: 395-447.
- Borgonovo, B., E. Cocucci, et al. (2002). "Regulated exocytosis: a novel, widely expressed system." *Nat Cell Biol* **4**(12): 955-62.
- Borisovska, M., Y. Zhao, et al. (2005). "v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion." *Embo J* **24**(12): 2114-26.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders, et al. (1990). "The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions." *Nature* **348**(6297): 125-32.
- Bowman, B. J. and E. J. Bowman (2002). "Mutations in subunit C of the vacuolar ATPase confer resistance to bafilomycin and identify a conserved antibiotic binding site." *J Biol Chem* **277**(6): 3965-72.
- Bowman, E. J. and B. J. Bowman (2005). "V-ATPases as drug targets." *J Bioenerg Biomembr* **37**(6): 431-5.
- Bowman, E. J., L. A. Graham, et al. (2004). "The bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **279**(32): 33131-8.
- Bowman, E. J., K. R. Gustafson, et al. (2003). "Identification of a new chondropsin class of antitumor compound that selectively inhibits V-ATPases." *J Biol Chem* **278**(45): 44147-52.
- Bowman, E. J., A. Siebers, et al. (1988). "Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21): 7972-6.
- Bowman, E. J., K. Tenney, et al. (1988). "Isolation of genes encoding the *Neurospora* vacuolar ATPase. Analysis of vma-1 encoding the 67-kDa subunit reveals homology to other ATPases." *J Biol Chem* **263**(28): 13994-4001.
- Brandhorst, D., D. Zwilling, et al. (2006). "Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(8): 2701-6.
- Bravo-Zehnder, M., P. Orio, et al. (2000). "Apical sorting of a voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel alpha-subunit in Madin-Darby canine kidney cells is independent of N-glycosylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13114-9.
- Brennwald, P., B. Kearns, et al. (1994). "Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis." *Cell* **79**(2): 245-58.
- Brennwald, P. and P. Novick (1993). "Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 and Sec4." *Nature* **362**(6420): 560-3.
- Brewer, C. B. and M. G. Roth (1991). "A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin." *J Cell Biol* **114**(3): 413-21.
- Bright, N. A., B. J. Reaves, et al. (1997). "Dense core lysosomes can fuse with late endosomes and are re-formed from the resultant hybrid organelles." *J Cell Sci* **110** (Pt 17): 2027-40.
- Brooks, D. R., P. J. Appleford, et al. (2003). "An essential role in molting and morphogenesis of *Caenorhabditis elegans* for ACN-1, a novel member of the angiotensin-converting enzyme family that lacks a metallopeptidase active site." *J Biol Chem* **278**(52): 52340-6.
- Brown, D. and S. Breton (2000). "H(+)-V-ATPase-dependent luminal acidification in the kidney collecting duct and the epididymis/vas deferens: vesicle recycling and transcytotic pathways." *J Exp Biol* **203**(Pt 1): 137-45.
- Brown, D. A., B. Crise, et al. (1989). "Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells." *Science* **245**(4925): 1499-501.
- Brown, D. A. and J. K. Rose (1992). "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface." *Cell* **68**(3): 533-44.
- Brown, P. S., E. Wang, et al. (2000). "Definition of distinct compartments in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells for membrane-volume sorting, polarized sorting and apical recycling." *Traffic* **1**(2): 124-40.
- Brozova, E., K. Simeckova, et al. (2006). "NHR-40, a *Caenorhabditis elegans* supplementary nuclear receptor, regulates embryonic and early larval development." *Mech Dev* **123**(9): 689-701.
- Brumell, J. H., A. Volchuk, et al. (1995). "Subcellular distribution of docking/fusion proteins in neutrophils, secretory cells with multiple exocytic compartments." *J Immunol* **155**(12): 5750-9.
- Buechner, M., D. H. Hall, et al. (1999). "Cystic canal mutants in *Caenorhabditis elegans* are defective in the apical membrane domain of the renal (excretory) cell." *Dev Biol* **214**(1): 227-41.
- Bult, C. J., O. White, et al. (1996). "Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*." *Science* **273**(5278): 1058-73.
- Burack, M. A., M. A. Silverman, et al. (2000). "The role of selective transport in neuronal protein sorting." *Neuron* **26**(2): 465-72.
- Burgoyne, R. D. and J. W. Barclay (2002). "Splitting the quantum: regulation of quantal release during vesicle fusion." *Trends Neurosci* **25**(4): 176-8.
- Burgoyne, R. D., R. J. Fisher, et al. (2001). "Regulation of kiss-and-run exocytosis." *Trends Cell Biol* **11**(10): 404-5.
- Burke, R., D. Nellen, et al. (1999). "Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells." *Cell* **99**(7): 803-15.
- Burkhardt, J. K., S. Hester, et al. (1990). "The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments." *J Cell Biol* **111**(6 Pt 1): 2327-40.
- Cabezas, A., K. G. Bache, et al. (2005). "Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes." *J Cell Sci* **118**(Pt 12): 2625-35.
- Calakos, N., M. K. Bennett, et al. (1994). "Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking." *Science* **263**(5150): 1146-9.
- Calakos, N., S. Schoch, et al. (2004). "Multiple roles for the active zone protein RIM1alpha in late stages of neurotransmitter release." *Neuron* **42**(6): 889-96.
- Cameron, P., O. Mundigl, et al. (1993). "Traffic of synaptic vesicle proteins in polarized and nonpolarized cells." *J Cell Sci Suppl* **17**: 93-100.

- Cans, A. S., N. Wittenberg, et al. (2003). "Artificial cells: unique insights into exocytosis using liposomes and lipid nanotubes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 400-4.
- Cao, X., N. Ballew, et al. (1998). "Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins." *Embo J* **17**(8): 2156-65.
- Caro, L. G. and G. E. Palade (1964). "Protein Synthesis, Storage, and Discharge in the Pancreatic Exocrine Cell. an Autoradiographic Study." *J Cell Biol* **20**: 473-95.
- Carraro-Lacroix, L. R. and G. Malnic (2006). "Signaling pathways involved with the stimulatory effect of Angiotensin II on vacuolar H(+)-ATPase in proximal tubule cells." *Pflugers Arch*.
- Casanova, J. E., G. Apodaca, et al. (1991). "An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor." *Cell* **66**(1): 65-75.
- Cassata, G., H. Kagoshima, et al. (1998). "Rapid expression screening of *Caenorhabditis elegans* homeobox open reading frames using a two-step polymerase chain reaction promoter-gfp reporter construction technique." *Gene* **212**(1): 127-35.
- Castillo-Avila, W., M. Abal, et al. (2005). "Non-apoptotic concentrations of prodigiosin (H+/Cl- symporter) inhibit the acidification of lysosomes and induce cell cycle blockage in colon cancer cells." *Life Sci* **78**(2): 121-7.
- Castillo, P. E., R. Janz, et al. (1997). "Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus." *Nature* **388**(6642): 590-3.
- Castle, J. D. (1990). "Sorting and secretory pathways in exocrine cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **2**(2): 119-26.
- Cereijido, M., E. S. Robbins, et al. (1978). "Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support." *J Cell Biol* **77**(3): 853-80.
- Certain, S., F. Barrat, et al. (2000). "Protein truncation test of LYST reveals heterogenous mutations in patients with Chediak-Higashi syndrome." *Blood* **95**(3): 979-83.
- Chabriat, M. L., C. Wilhelm, et al. (2005). "Rab8 regulates the actin-based movement of melanosomes." *Mol Biol Cell* **16**(4): 1640-50.
- Chamberlain, L. H., R. D. Burgoyne, et al. (2001). "SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10): 5619-24.
- Chamoun, Z., R. K. Mann, et al. (2001). "Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal." *Science* **293**(5537): 2080-4.
- Chang, S., R. J. Johnston, Jr., et al. (2004). "MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode." *Nature* **430**(7001): 785-9.
- Chanturiya, A., L. V. Chernomordik, et al. (1997). "Flickering fusion pores comparable with initial exocytic pores occur in protein-free phospholipid bilayers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14423-8.
- Chaput, N., J. Taieb, et al. (2005). "The potential of exosomes in immunotherapy." *Expert Opin Biol Ther* **5**(6): 737-47.
- Charsky, C. M., N. J. Schumann, et al. (2000). "Mutational analysis of subunit G (Vma10p) of the yeast vacuolar H+-ATPase." *J Biol Chem* **275**(47): 37232-9.
- Chavez, C., E. J. Bowman, et al. (2006). "Analysis of Strains with Mutations in Six Genes Encoding Subunits of the V-ATPase: EUKARYOTES DIFFER IN THE COMPOSITION OF THE V₀ SECTOR OF THE ENZYME." *J Biol Chem* **281**(37): 27052-62.
- Chavrier, P., J. P. Gorvel, et al. (1991). "Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal." *Nature* **353**(6346): 769-72.
- Chavrier, P. and B. Goud (1999). "The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport." *Curr Opin Cell Biol* **11**(4): 466-75.
- Chen, L., Z. W. Wang, et al. (2006). "Roles of cortactin, an actin polymerization mediator, in cell endocytosis." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **38**(2): 95-103.
- Chen, M. H., Y. J. Li, et al. (2004). "Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates." *Genes Dev* **18**(6): 641-59.
- Chen, S. H., M. R. Bubb, et al. (2004). "Vacuolar H+-ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol 3-kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B." *J Biol Chem* **279**(9): 7988-98.
- Chen, X., L. Wang, et al. (2005). ""Kiss-and-run" glutamate secretion in cultured and freshly isolated rat hippocampal astrocytes." *J Neurosci* **25**(40): 9236-43.
- Chen, X. K., Y. F. Xiong, et al. (2006). ""Kiss-and-Run" Exocytosis in Astrocytes." *Neuroscientist* **12**(5): 375-8.
- Chen, Y. A., S. J. Scales, et al. (2001). "Calcium regulation of exocytosis in PC12 cells." *J Biol Chem* **276**(28): 26680-7.
- Chen, Z., D. J. Eastburn, et al. (2004). "The *Caenorhabditis elegans* nuclear receptor gene nhr-25 regulates epidermal cell development." *Mol Cell Biol* **24**(17): 7345-58.
- Cheong, K. H., D. Zacchetti, et al. (1999). "VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11): 6241-8.
- Chernomordik, L. V. and M. M. Kozlov (2003). "Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes." *Annu Rev Biochem* **72**: 175-207.
- Chernomordik, L. V. and M. M. Kozlov (2005). "Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps." *Cell* **123**(3): 375-82.
- Chiang, H. L., S. R. Terlecky, et al. (1989). "A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins." *Science* **246**(4928): 382-5.
- Chizmadzhev, Y. A., D. A. Kumenko, et al. (1999). "Lipid flow through fusion pores connecting membranes of different tensions." *Biophys J* **76**(6): 2951-65.
- Choi, K. Y., Y. J. Ji, et al. (2003). "Vacuolar-type H+-ATPase E subunit is required for embryogenesis and yolk transfer in *Caenorhabditis elegans*." *Gene* **311**: 13-23.
- Chung, J. H., R. L. Lester, et al. (2003). "Sphingolipid requirement for generation of a functional v1 component of the vacuolar ATPase." *J Biol Chem* **278**(31): 28872-81.
- Clandinin, T. R. (2005). "Surprising twists to exocyst function." *Neuron* **46**(2): 164-6.
- Clark, R. and G. M. Griffiths (2003). "Lytic granules, secretory lysosomes and disease." *Curr Opin Immunol* **15**(5): 516-21.
- Clary, D. O., I. C. Griff, et al. (1990). "SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast." *Cell* **61**(4): 709-21.
- Cocucci, E., G. Racchetti, et al. (2004). "Enlargeosome, an exocytic vesicle resistant to nonionic detergents, undergoes endocytosis via a nonacidic route." *Mol Biol Cell* **15**(12): 5356-68.
- Cohen, F. S. and G. B. Melikyan (2004). "The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement." *J Membr Biol* **199**(1): 1-14.

- Cohen, M. M., Jr. (2003). "The hedgehog signaling network." *Am J Med Genet A* **123**(1): 5-28.
- Collins, K. M., N. L. Thorngren, et al. (2005). "Sec17p and HOPS, in distinct SNARE complexes, mediate SNARE complex disruption or assembly for fusion." *Embo J* **24**(10): 1775-86.
- Compton, M. A., L. A. Graham, et al. (2006). "Vma9p (subunit e) is an integral membrane V0 subunit of the yeast V-ATPase." *J Biol Chem* **281**(22): 15312-9.
- Conibear, E., J. N. Cleck, et al. (2003). "Vps51p mediates the association of the GARP (Vps52/53/54) complex with the late Golgi t-SNARE Tlg1p." *Mol Biol Cell* **14**(4): 1610-23.
- Cooney, J. R., J. L. Hurlburt, et al. (2002). "Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane." *J Neurosci* **22**(6): 2215-24.
- Costa, M., B. W. Draper, et al. (1997). "The role of actin filaments in patterning the *Caenorhabditis elegans* cuticle." *Dev Biol* **184**(2): 373-84.
- Couillault, C., N. Pujol, et al. (2004). "TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM." *Nat Immunol* **5**(5): 488-94.
- Crider, B. P. and X. S. Xie (2003). "Characterization of the functional coupling of bovine brain vacuolar-type H(+)-translocating ATPase. Effect of divalent cations, phospholipids, and subunit H (SFD)." *J Biol Chem* **278**(45): 44281-8.
- Crowther, R. A. and B. M. Pearse (1981). "Assembly and packing of clathrin into coats." *J Cell Biol* **91**(3 Pt 1): 790-7.
- Cuervo, A. M. and J. F. Dice (1996). "A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes." *Science* **273**(5274): 501-3.
- Cuervo, A. M. and J. F. Dice (2000). "Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane." *Traffic* **1**(7): 570-83.
- Cunningham, K. W. and G. R. Fink (1994). "Ca²⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae".* *J Exp Biol* **196**: 157-66.
- Curtis, K. K., S. A. Francis, et al. (2002). "Mutational analysis of the subunit C (Vma5p) of the yeast vacuolar H+-ATPase." *J Biol Chem* **277**(11): 8979-88.
- Dames, P., B. Zimmermann, et al. (2006). "cAMP regulates plasma membrane vacuolar-type H+-ATPase assembly and activity in blowfly salivary glands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3926-31.
- Danino, D., K. H. Moon, et al. (2004). "Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin." *J Struct Biol* **147**(3): 259-67.
- Dascher, C., R. Ossig, et al. (1991). "Identification and structure of four yeast genes (SLY) that are able to suppress the functional loss of YPT1, a member of the RAS superfamily." *Mol Cell Biol* **11**(2): 872-85.
- Dashti, N. and G. Wolfbauer (1987). "Secretion of lipids, apolipoproteins, and lipoproteins by human hepatoma cell line, HepG2: effects of oleic acid and insulin." *J Lipid Res* **28**(4): 423-36.
- Davis, M. W., A. J. Birnie, et al. (2004). "A conserved metalloprotease mediates ecdysis in *Caenorhabditis elegans".* *Development* **131**(23): 6001-8.
- Dawson, J. C., J. A. Legg, et al. (2006). "Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis." *Trends Cell Biol*.
- de Gassart, A., C. Geminard, et al. (2003). "Lipid raft-associated protein sorting in exosomes." *Blood* **102**(13): 4336-44.
- de Hoop, M. J. and C. G. Dotti (1993). "Membrane traffic in polarized neurons in culture." *J Cell Sci Suppl* **17**: 85-92.
- De Ley, P. and M. Blaxter (2004). "A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa." *Nematology Monographs and Perspectives* **2**: 633-653.
- De Milito, A. and S. Fais (2005). "Proton pump inhibitors may reduce tumour resistance." *Expert Opin Pharmacother* **6**(7): 1049-54.
- de Verneuil, M. C. and O. Benichou (2001). "Human osteopetrosis and other sclerosing disorders: recent genetic developments." *Calcif Tissue Int* **69**(1): 1-6.
- Deak, F., O. H. Shin, et al. (2006). "Structural determinants of synaptobrevin 2 function in synaptic vesicle fusion." *J Neurosci* **26**(25): 6668-76.
- Deak, F., O. H. Shin, et al. (2006). "Rabphilin regulates SNARE-dependent re-priming of synaptic vesicles for fusion." *Embo J* **25**(12): 2856-66.
- del Campo, J. J., E. Opoku-Serebuoh, et al. (2005). "Fusogenic activity of EFF-1 is regulated via dynamic localization in fusing somatic cells of *C. elegans".* *Curr Biol* **15**(5): 413-23.
- Dell'Angelica, E. C., R. Puertollano, et al. (2000). "GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex." *J Cell Biol* **149**(1): 81-94.
- Der, C. J., T. G. Krontiris, et al. (1982). "Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(11): 3637-40.
- DerMardirossian, C. and G. M. Bokoch (2005). "GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation." *Trends Cell Biol* **15**(7): 356-63.
- Dermine, J. F., S. Duclos, et al. (2001). "Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes." *J Biol Chem* **276**(21): 18507-12.
- Dettmer, J., A. Hong-Hermesdorf, et al. (2006). "Vacuolar H+-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis".* *Plant Cell* **18**(3): 715-30.
- Dietl, P. and T. Haller (2000). "Persistent fusion pores but transient fusion in alveolar type II cells." *Cell Biol Int* **24**(11): 803-7.
- Dietl, P., T. Haller, et al. (2001). "Mechanisms of surfactant exocytosis in alveolar type II cells in vitro and in vivo." *News Physiol Sci* **16**: 239-43.
- Diez, M., M. Borsch, et al. (2004). "Binding of the b-subunit in the ATP synthase from *Escherichia coli".* *Biochemistry* **43**(4): 1054-64.
- Diez, M., B. Zimmermann, et al. (2004). "Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F0F1-ATP synthase." *Nat Struct Mol Biol* **11**(2): 135-41.
- Dixon, J. L. and H. N. Ginsberg (1993). "Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells." *J Lipid Res* **34**(2): 167-79.
- Dobbs, L. G. (1990). "Isolation and culture of alveolar type II cells." *Am J Physiol* **258**(4 Pt 1): L134-47.
- Dollar, G., E. Struckhoff, et al. (2002). "Rab11 polarization of the *Drosophila* oocyte: a novel link between membrane trafficking, microtubule organization, and oskar mRNA localization and translation." *Development* **129**(2): 517-26.
- Drab, M., P. Verkade, et al. (2001). "Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice." *Science* **293**(5539): 2449-52.
- Drory, O., F. Frolov, et al. (2004). "Crystal structure of yeast V-ATPase subunit C reveals its stator function." *EMBO Rep* **5**(12): 1148-52.
- Drose, S. and K. Altendorf (1997). "Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases." *J Exp Biol* **200**(Pt 1): 1-8.

- Duden, R. (2001). "The GGA's pick up their coat." *Trends Cell Biol* **11**(6): 239.
- Dulubova, I., X. Lou, et al. (2005). "A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity?" *Embo J* **24**(16): 2839-50.
- Duman, J. G. and J. G. Forte (2003). "What is the role of SNARE proteins in membrane fusion?" *Am J Physiol Cell Physiol* **285**(2): C237-49.
- Dunant, Y. and M. Israel (2000). "Neurotransmitter release at rapid synapses." *Biochimie* **82**(4): 289-302.
- Durell, S. R., I. Martin, et al. (1997). "What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion (review)." *Mol Membr Biol* **14**(3): 97-112.
- Durrbach, A., G. Raposo, et al. (2000). "Truncated brush border myosin I affects membrane traffic in polarized epithelial cells." *Traffic* **1**(5): 411-24.
- Eaton, S. (2006). "Release and trafficking of lipid-linked morphogens." *Curr Opin Genet Dev* **16**(1): 17-22.
- Echard, A., A. el Marjou, et al. (2001). "Expression, purification, and biochemical properties of rabkinesin-6 domains and their interactions with Rab6A." *Methods Enzymol* **329**: 157-65.
- Echard, A., F. Jollivet, et al. (1998). "Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6." *Science* **279**(5350): 580-5.
- Edidin, M. (1997). "Lipid microdomains in cell surface membranes." *Curr Opin Struct Biol* **7**(4): 528-32.
- Ehrenfeld, J. and U. Klein (1997). "The key role of the H⁺ V-ATPase in acid-base balance and Na⁺ transport processes in frog skin." *J Exp Biol* **200**(Pt 2): 247-56.
- Eiden, L. E. (2000). "The vesicular neurotransmitter transporters: current perspectives and future prospects." *Faseb J* **14**(15): 2396-400.
- Ellgaard, L. and L. W. Ruddock (2005). "The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties." *EMBO Rep* **6**(1): 28-32.
- Entchev, E. V. and M. A. Gonzalez-Gaitan (2002). "Morphogen gradient formation and vesicular trafficking." *Traffic* **3**(2): 98-109.
- Erickson, J. W. and R. A. Cerione (2004). "Structural elements, mechanism, and evolutionary convergence of Rho protein-guanine nucleotide exchange factor complexes." *Biochemistry* **43**(4): 837-42.
- Falk-Vairant, J., P. Correges, et al. (1996). "Evoked acetylcholine release expressed in neuroblastoma cells by transfection of mediatophore cDNA." *J Neurochem* **66**(3): 1322-5.
- Falk-Vairant, J., P. Correges, et al. (1996). "Quantal acetylcholine release induced by mediatophore transfection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(11): 5203-7.
- Fares, H. and I. Greenwald (2001). "Regulation of endocytosis by CUP-5, the *Caenorhabditis elegans* mucolipin-1 homolog." *Nat Genet* **28**(1): 64-8.
- Farsad, K., N. Ringstad, et al. (2001). "Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions." *J Cell Biol* **155**(2): 193-200.
- Fasshauer, D. (2003). "Structural insights into the SNARE mechanism." *Biochim Biophys Acta* **1641**(2-3): 87-97.
- Fasshauer, D., W. Antonin, et al. (1999). "Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties." *J Biol Chem* **274**(22): 15440-6.
- Fasshauer, D., W. Antonin, et al. (2002). "SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis." *Nat Struct Biol* **9**(2): 144-51.
- Fasshauer, D., R. B. Sutton, et al. (1998). "Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15781-6.
- Feng, Y. and M. Forgac (1992). "A novel mechanism for regulation of vacuolar acidification." *J Biol Chem* **267**(28): 19769-72.
- Feng, Y. and M. Forgac (1994). "Inhibition of vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase by disulfide bond formation between cysteine 254 and cysteine 532 in subunit A." *J Biol Chem* **269**(18): 13224-30.
- Fernandez-Borja, M., R. Wubbolds, et al. (1999). "Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidyl-inositol 3-kinase activity." *Curr Biol* **9**(1): 55-8.
- Fesce, R., F. Grohovaz, et al. (1994). "Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'?" *Trends Cell Biol* **4**(1): 1-4.
- Fethiere, J., D. Venzke, et al. (2004). "Building the stator of the yeast vacuolar-ATPase: specific interaction between subunits E and G." *J Biol Chem* **279**(39): 40670-6.
- Fethiere, J., D. Venzke, et al. (2005). "Peripheral stator of the yeast V-ATPase: stoichiometry and specificity of interaction between the EG complex and subunits C and H." *Biochemistry* **44**(48): 15906-14.
- Fetterer, R. H. and M. L. Rhoads (1993). "Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock." *Vet Parasitol* **46**(1-4): 103-11.
- Fevrier, B. and G. Raposo (2004). "Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages." *Curr Opin Cell Biol* **16**(4): 415-21.
- Fevrier, B., D. Vilette, et al. (2005). "Exosomes: a bubble ride for prions?" *Traffic* **6**(1): 10-7.
- Findlay, J. B. and M. A. Harrison (2002). "A protein chemical approach to channel structure and function: the proton channel of the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase." *Novartis Found Symp* **245**: 207-18; discussion 218-22, 261-4.
- Fischer von Mollard, G. and T. H. Stevens (1999). "The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole." *Mol Biol Cell* **10**(6): 1719-32.
- Fisher, C. E. and S. E. Howie (2006). "The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development." *Dev Biol* **296**(2): 279-97.
- Fivaz, M., F. Vilbois, et al. (2002). "Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins." *Embo J* **21**(15): 3989-4000.
- Fok, A. K., M. S. Aihara, et al. (1995). "The pegs on the decorated tubules of the contractile vacuole complex of Paramecium are proton pumps." *J Cell Sci* **108** (Pt 10): 3163-70.
- Fok, A. K. and R. D. Allen (1990). "The phagosome-lysosome membrane system and its regulation in Paramecium." *Int Rev Cytol* **123**: 61-94.
- Fok, A. K., K. Yamauchi, et al. (2002). "The vacuolar-ATPase of Paramecium multimicronucleatum: gene structure of the B subunit and the dynamics of the V-ATPase-rich osmoregulatory membranes." *J Eukaryot Microbiol* **49**(3): 185-96.
- Folsch, H. (2005). "The building blocks for basolateral vesicles in polarized epithelial cells." *Trends Cell Biol* **15**(4): 222-8.
- Folsch, H., H. Ohno, et al. (1999). "A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells." *Cell* **99**(2): 189-98.
- Folsch, H., M. Pypaert, et al. (2003). "The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains." *J Cell Biol* **163**(2): 351-62.
- Folsch, H., M. Pypaert, et al. (2001). "Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells." *J Cell Biol* **152**(3): 595-606.
- Forgac, M. (1999). "The vacuolar H⁺-ATPase of clathrin-coated vesicles is reversibly inhibited by S-nitrosoglutathione." *J Biol Chem* **274**(3): 1301-5.

- Franco, M., P. Chardin, et al. (1995). "Myristylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels." *J Biol Chem* **270**(3): 1337-41.
- Frandsen, A. R., S. Russel, et al. (2005). "Functional genomic analysis of *C. elegans* molting." *PLoS Biol* **3**(10): e312.
- Fraser, A. G., R. S. Kamath, et al. (2000). "Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference." *Nature* **408**(6810): 325-30.
- Frattini, A., P. J. Orchard, et al. (2000). "Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis." *Nat Genet* **25**(3): 343-6.
- Fuchs, E., B. Short, et al. (2005). "Assay and properties of rab6 interaction with dynein-dynactin complexes." *Methods Enzymol* **403**: 607-18.
- Fujimoto, D. and S. Kanaya (1973). "Cuticlin: a noncollagen structural protein from *Ascaris* cuticle." *Arch Biochem Biophys* **157**(1): 1-6.
- Fujita, H., M. Yamanaka, et al. (2003). "A dominant negative form of the AAA ATPase SKD1/VPS4 impairs membrane trafficking out of endosomal/lysosomal compartments: class E vps phenotype in mammalian cells." *J Cell Sci* **116**(Pt 2): 401-14.
- Fujita, M., D. Hawkinson, et al. (2003). "The role of the ELAV homologue EXC-7 in the development of the *Caenorhabditis elegans* excretory canals." *Dev Biol* **256**(2): 290-301.
- Fujita, M., F. Reinhart, et al. (1990). "Convergence of apical and basolateral endocytic pathways at apical late endosomes in absorptive cells of suckling rat ileum *in vivo*." *J Cell Sci* **97** (Pt 2): 385-94.
- Fujiwara, T., K. Ritchie, et al. (2002). "Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane." *J Cell Biol* **157**(6): 1071-81.
- Fullekrug, J., P. Scheiffele, et al. (1999). "VIP36 localisation to the early secretory pathway." *J Cell Sci* **112** (Pt 17): 2813-21.
- Furuchi, T., K. Aikawa, et al. (1993). "Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, blocks lysosomal cholesterol trafficking in macrophages." *J Biol Chem* **268**(36): 27345-8.
- Futter, C. E., L. M. Collinson, et al. (2001). "Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes." *J Cell Biol* **155**(7): 1251-64.
- Futter, C. E., A. Gibson, et al. (1998). "In polarized MDCK cells basolateral vesicles arise from clathrin-gamma-adaptin-coated domains on endosomal tubules." *J Cell Biol* **141**(3): 611-23.
- Futter, C. E., A. Pearse, et al. (1996). "Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes." *J Cell Biol* **132**(6): 1011-23.
- Gaborik, Z. and L. Hunyady (2004). "Intracellular trafficking of hormone receptors." *Trends Endocrinol Metab* **15**(6): 286-93.
- Gagescu, R., N. Demaurex, et al. (2000). "The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components." *Mol Biol Cell* **11**(8): 2775-91.
- Gaisano, H. Y. (2000). "A hypothesis: SNARE-ing the mechanisms of regulated exocytosis and pathologic membrane fusions in the pancreatic acinar cell." *Pancreas* **20**(3): 217-26.
- Gallet, A., R. Rodriguez, et al. (2003). "Cholesterol modification of hedgehog is required for trafficking and movement, revealing an asymmetric cellular response to hedgehog." *Dev Cell* **4**(2): 191-204.
- Gallet, A., L. Ruel, et al. (2006). "Cholesterol modification is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in *Drosophila* epithelia." *Development* **133**(3): 407-18.
- Gallet, A. and P. P. Therond (2005). "Temporal modulation of the Hedgehog morphogen gradient by a patched-dependent targeting to lysosomal compartment." *Dev Biol* **277**(1): 51-62.
- Gallop, J. L. and H. T. McMahon (2005). "BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR." *Biochem Soc Symp*(72): 223-31.
- Gallwitz, D., C. Donath, et al. (1983). "A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product." *Nature* **306**(5944): 704-7.
- Garcia-Mata, R., T. Szul, et al. (2003). "ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GEF1." *Mol Biol Cell* **14**(6): 2250-61.
- Gengyo-Ando, K. and S. Mitani (2000). "Characterization of mutations induced by ethyl methanesulfonate, UV, and trimethylpsoralen in the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Biochem Biophys Res Commun* **269**(1): 64-9.
- Geppert, M., V. Y. Bolshakov, et al. (1994). "The role of Rab3A in neurotransmitter release." *Nature* **369**(6480): 493-7.
- Geppert, M., Y. Goda, et al. (1997). "The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion." *Nature* **387**(6635): 810-4.
- Getlawi, F., A. Laslop, et al. (1996). "Chromaffin granule membrane glycoprotein IV is identical with Ac45, a membrane-integral subunit of the granule's H(+)-ATPase." *Neurosci Lett* **219**(1): 13-6.
- Geuze, H. J., J. W. Slot, et al. (1983). "Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis." *Cell* **32**(1): 277-87.
- Geyer, M., O. T. Fackler, et al. (2002). "Subunit H of the V-ATPase involved in endocytosis shows homology to beta-adaptins." *Mol Biol Cell* **13**(6): 2045-56.
- Geyer, M., H. Yu, et al. (2002). "Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain of adaptor protein complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery." *J Biol Chem* **277**(32): 28521-9.
- Gharieb, M. M. and G. M. Gadd (1998). "Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal(loid) tolerance: vacuolar-lacking and -defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite." *Biometals* **11**(2): 101-6.
- Ghosh, P., N. M. Dahms, et al. (2003). "Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(3): 202-12.
- Ghosh, P. and S. Kornfeld (2004). "The GGA proteins: key players in protein sorting at the trans-Golgi network." *Eur J Cell Biol* **83**(6): 257-62.
- Gibbs, D., S. M. Azarian, et al. (2004). "Role of myosin VIIa and Rab27a in the motility and localization of RPE melanosomes." *J Cell Sci* **117**(Pt 26): 6473-83.
- Gibson, A., C. E. Futter, et al. (1998). "Sorting mechanisms regulating membrane protein traffic in the apical transcytotic pathway of polarized MDCK cells." *J Cell Biol* **143**(1): 81-94.
- Gillingham, A. K., A. C. Pfeifer, et al. (2002). "CASP, the alternatively spliced product of the gene encoding the CCAAT-displacement protein transcription factor, is a Golgi membrane protein related to giantin." *Mol Biol Cell* **13**(11): 3761-74.
- Giraudo, C. G., C. Hu, et al. (2005). "SNAREs can promote complete fusion and hemifusion as alternative outcomes." *J Cell Biol* **170**(2): 249-60.
- Gkantiragis, I., B. Brugger, et al. (2001). "Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex." *Mol Biol Cell* **12**(6): 1819-33.

- Glick, B. S. and J. E. Rothman (1987). "Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport." *Nature* **326**(6110): 309-12.
- Glickman, J. N. and S. Kornfeld (1993). "Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts." *J Cell Biol* **123**(1): 99-108.
- Gluck, S. L., R. D. Nelson, et al. (1992). "Biochemistry of the renal V-ATPase." *J Exp Biol* **172**: 219-29.
- Gogarten, J. P., T. Starke, et al. (1992). "Evolution and isoforms of V-ATPase subunits." *J Exp Biol* **172**: 137-47.
- Goody, R. S., A. Rak, et al. (2005). "The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments." *Cell Mol Life Sci* **62**(15): 1657-70.
- Grabowski, R. and D. Gallwitz (1997). "High-affinity binding of the yeast cis-Golgi t-SNARE, Sed5p, to wild-type and mutant Sly1p, a modulator of transport vesicle docking." *FEBS Lett* **411**(2-3): 169-72.
- Graham, L. A., A. R. Flannery, et al. (2003). "Structure and assembly of the yeast V-ATPase." *J Bioenerg Biomembr* **35**(4): 301-12.
- Grant, B. and D. Hirsh (1999). "Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte." *Mol Biol Cell* **10**(12): 4311-26.
- Gravato-Nobre, M. J., H. R. Nicholas, et al. (2005). "Multiple genes affect sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to the bacterial pathogen *Microbacterium nematophilum*." *Genetics* **171**(3): 1033-45.
- Greco, V., M. Hannus, et al. (2001). "Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia." *Cell* **106**(5): 633-45.
- Griffiths, G. and K. Simons (1986). "The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex." *Science* **234**(4775): 438-43.
- Griffiths, G. M. (1996). "Secretory lysosomes - a special mechanism of regulated secretion in haemopoietic cells." *Trends Cell Biol* **6**(9): 329-32.
- Griffiths, G. M. (2002). "Albinism and immunity: what's the link?" *Curr Mol Med* **2**(5): 479-83.
- Grindstaff, K. K., C. Yeaman, et al. (1998). "Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells." *Cell* **93**(5): 731-40.
- Gronlien, H. K., C. Stock, et al. (2002). "Relationship between the membrane potential of the contractile vacuole complex and its osmoregulatory activity in *Paramecium multimicronucleatum*." *J Exp Biol* **205**(Pt 20): 3261-70.
- Grote, E., M. Baba, et al. (2000). "Geranylgeranylated SNAREs are dominant inhibitors of membrane fusion." *J Cell Biol* **151**(2): 453-66.
- Gruber, G. (2005). "Structural features and nucleotide-binding capability of the C subunit are integral to the regulation of the eukaryotic V₁V_o ATPases." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 4): 883-5.
- Gruenberg, J. and H. Stenmark (2004). "The biogenesis of multivesicular endosomes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 317-23.
- Guo, W., D. Roth, et al. (1999). "The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis." *Embo J* **18**(4): 1071-80.
- Guo, Y. and A. D. Linstedt (2006). "COPII-Golgi protein interactions regulate COPII coat assembly and Golgi size." *J Cell Biol* **174**(1): 53-63.
- Guo, Z., C. Turner, et al. (1998). "Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells." *Cell* **94**(4): 537-48.
- Gut, A., F. Kappeler, et al. (1998). "Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins." *Embo J* **17**(7): 1919-29.
- Habermann, B. (2004). "The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding?" *EMBO Rep* **5**(3): 250-5.
- Hagiwara, Y., T. Sasaoka, et al. (2000). "Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice." *Hum Mol Genet* **9**(20): 3047-54.
- Hall, T. J. (1994). "Cytotoxicity of vacuolar H(+)-ATPase inhibitors to UMR-106 rat osteoblasts: an effect on iron uptake into cells?" *Cell Biol Int* **18**(3): 189-93.
- Haller, T., P. Dietl, et al. (2001). "Fusion pore expansion is a slow, discontinuous, and Ca²⁺-dependent process regulating secretion from alveolar type II cells." *J Cell Biol* **155**(2): 279-89.
- Haller, T., J. Ortmayr, et al. (1998). "Dynamics of surfactant release in alveolar type II cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(4): 1579-84.
- Hamilton, C. A., A. G. Good, et al. (2001). "Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat." *Plant Physiol* **125**(4): 2068-77.
- Han, N., Q. Shao, et al. (2005). "The leaf tonoplast V-H(+)-Atpase activity of a C3 halophyte *Suaeda salsa* is enhanced by salt stress in a Ca-dependent mode." *J Plant Physiol* **162**(3): 267-74.
- Hanada, H., Y. Moriyama, et al. (1990). "Kinetic studies of chromaffin granule H+-ATPase and effects of baflomycin A1." *Biochem Biophys Res Commun* **170**(2): 873-8.
- Hanada, K., M. Nishijima, et al. (1995). "Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes." *J Biol Chem* **270**(11): 6254-60.
- Hannan, L. A., M. P. Lisanti, et al. (1993). "Correctly sorted molecules of a GPI-anchored protein are clustered and immobile when they arrive at the apical surface of MDCK cells." *J Cell Biol* **120**(2): 353-8.
- Hansen, G. H., J. Pedersen, et al. (2003). "Deep-apical tubules: dynamic lipid-raft microdomains in the brush-border region of enterocytes." *Biochem J* **373**(Pt 1): 125-32.
- Hanson, P. I., R. Roth, et al. (1997). "Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy." *Cell* **90**(3): 523-35.
- Hao, L., G. Aspock, et al. (2006). "The hedgehog-related gene wrt-5 is essential for hypodermal development in *Caenorhabditis elegans*." *Dev Biol* **290**(2): 323-36.
- Hao, L., K. Mukherjee, et al. (2006). "The hedgehog-related gene qua-1 is required for molting in *Caenorhabditis elegans*." *Dev Dyn* **235**(6): 1469-81.
- Harding, C., J. Heuser, et al. (1983). "Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes." *J Cell Biol* **97**(2): 329-39.
- Harrell, P. C., L. J. McCawley, et al. (2005). "Proliferative effects of apical, but not basal, matrix metalloproteinase-7 activity in polarized MDCK cells." *Exp Cell Res* **303**(2): 308-20.
- Hartzell, P. L. (1997). "Complementation of sporulation and motility defects in a prokaryote by a eukaryotic GTPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(18): 9881-6.
- Harvey, W. R. and H. Wieczorek (1997). "Animal plasma membrane energization by chemiosmotic H+ V-ATPases." *J Exp Biol* **200**(Pt 2): 203-16.

- Hauri, H. P. and K. Matter (1991). "Protein traffic in intestinal epithelial cells." *Semin Cell Biol* **2**(6): 355-64.
- Heeren, J., U. Beisiegel, et al. (2006). "Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(3): 442-8.
- Heinrich, R. and T. A. Rapoport (2005). "Generation of nonidentical compartments in vesicular transport systems." *J Cell Biol* **168**(2): 271-80.
- Hell, J. W., P. R. Maycox, et al. (1990). "Energy dependence and functional reconstitution of the gamma-aminobutyric acid carrier from synaptic vesicles." *J Biol Chem* **265**(4): 2111-7.
- Hemenway, C. S., K. Dolinski, et al. (1995). "vph6 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* require calcineurin for growth and are defective in vacuolar H(+)-ATPase assembly." *Genetics* **141**(3): 833-44.
- Henkel, A. W. and W. J. Betz (1995). "Staurosporine blocks evoked release of FM1-43 but not acetylcholine from frog motor nerve terminals." *J Neurosci* **15**(12): 8246-58.
- Henriksen, K., M. G. Sorensen, et al. (2006). "Degradation of the organic phase of bone by osteoclasts: a secondary role for lysosomal acidification." *J Bone Miner Res* **21**(1): 58-66.
- Hibi, T., N. Hirashima, et al. (2000). "Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes." *Biochem Biophys Res Commun* **271**(1): 36-41.
- Hidari, K., S. Ichikawa, et al. (1996). "Complete removal of sphingolipids from the plasma membrane disrupts cell to substratum adhesion of mouse melanoma cells." *J Biol Chem* **271**(24): 14636-41.
- Hiesinger, P. R., A. Fayyazuddin, et al. (2005). "The v-ATPase V0 subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*." *Cell* **121**(4): 607-20.
- Hilario, E. and J. P. Gogarten (1993). "Horizontal transfer of ATPase genes--the tree of life becomes a net of life." *Biosystems* **31**(2-3): 111-9.
- Hilario, E. and J. P. Gogarten (1998). "The prokaryote-to-eukaryote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits." *J Mol Evol* **46**(6): 703-15.
- Hill, E., J. van Der Kaay, et al. (2001). "The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission." *J Cell Biol* **152**(2): 309-23.
- Hill, K. J. and T. H. Stevens (1994). "Vma21p is a yeast membrane protein retained in the endoplasmic reticulum by a di-lysine motif and is required for the assembly of the vacuolar H(+)-ATPase complex." *Mol Biol Cell* **5**(9): 1039-50.
- Hill, K. J. and T. H. Stevens (1995). "Vma22p is a novel endoplasmic reticulum-associated protein required for assembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase complex." *J Biol Chem* **270**(38): 22329-36.
- Hirata, R., N. Umemoto, et al. (1993). "VMA12 is essential for assembly of the vacuolar H(+)-ATPase subunits onto the vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **268**(2): 961-7.
- Hirata, T., A. Iwamoto-Kihara, et al. (2003). "Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: relative rotation of the G and C subunits." *J Biol Chem* **278**(26): 23714-9.
- Hirata, T., N. Nakamura, et al. (2000). "Regulation and reversibility of vacuolar H(+)-ATPase." *J Biol Chem* **275**(1): 386-9.
- Hirschberg, K., C. M. Miller, et al. (1998). "Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells." *J Cell Biol* **143**(6): 1485-503.
- Hirst, J., W. W. Lui, et al. (2000). "A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome." *J Cell Biol* **149**(1): 67-80.
- Hirst, J. and M. S. Robinson (1998). "Clathrin and adaptors." *Biochim Biophys Acta* **1404**(1-2): 173-93.
- Ho, C., S. J. Slater, et al. (2001). "The C1 domain of protein kinase C as a lipid bilayer surface sensing module." *Biochemistry* **40**(34): 10334-41.
- Hobert, O., R. J. Johnston, Jr., et al. (2002). "Left-right asymmetry in the nervous system: the *Caenorhabditis elegans* model." *Nat Rev Neurosci* **3**(8): 629-40.
- Hobot, J. A. and G. R. Newman (1996). "Immunomicroscopy: resin techniques and on-section labelling with immunocolloidal gold or immunoperoxidase--planning a protocol." *Scanning Microsc* **10**(1): 121-43; discussion 143-5.
- Hodgkin, J., P. E. Kuwabara, et al. (2000). "A novel bacterial pathogen, *Microbacterium nematophilum*, induces morphological change in the nematode *C. elegans*." *Curr Biol* **10**(24): 1615-8.
- Hoekstra, D., D. Tytela, et al. (2004). "The subapical compartment: a traffic center in membrane polarity development." *J Cell Sci* **117**(Pt 11): 2183-92.
- Hoekstra, D., M. M. Zegers, et al. (1999). "Membrane flow, lipid sorting and cell polarity in HepG2 cells: role of a subapical compartment." *Biochem Soc Trans* **27**(4): 422-8.
- Hofmann, I. and S. Munro (2006). "An N-terminally acetylated Arf-like GTPase is localised to lysosomes and affects their motility." *J Cell Sci* **119**(Pt 8): 1494-503.
- Holliday, L. S., M. Lu, et al. (2000). "The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H+-ATPase contains a filamentous actin binding site." *J Biol Chem* **275**(41): 32331-7.
- Hollyfield, J. G., H. H. Varner, et al. (1985). "Participation of photoreceptor cells in retrieval and degradation of components in the interphotoreceptor matrix." *Prog Clin Biol Res* **190**: 171-5.
- Holthuis, J. C., E. J. Jansen, et al. (1999). "Biosynthesis of the vacuolar H+-ATPase accessory subunit Ac45 in *Xenopus* pituitary." *Eur J Biochem* **262**(2): 484-91.
- Holthuis, J. C. and T. P. Levine (2005). "Lipid traffic: floppy drives and a superhighway." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(3): 209-20.
- Holz, R. W., W. H. Brondyk, et al. (1994). "Evidence for the involvement of Rab3A in Ca(2+)-dependent exocytosis from adrenal chromaffin cells." *J Biol Chem* **269**(14): 10229-34.
- Hong-Hermesdorf, A., A. Brux, et al. (2006). "A WNK kinase binds and phosphorylates V-ATPase subunit C." *FEBS Lett* **580**(3): 932-9.
- Hong, W. (2005). "SNAREs and traffic." *Biochim Biophys Acta* **1744**(2): 120-44.
- Horiuchi, H., A. Giner, et al. (1995). "A GDP/GTP exchange-stimulatory activity for the Rab5-RabGDI complex on clathrin-coated vesicles from bovine brain." *J Biol Chem* **270**(19): 11257-62.
- Horton, A. C., B. Racz, et al. (2005). "Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis." *Neuron* **48**(5): 757-71.
- Hosaka, T., C. C. Brooks, et al. (2005). "p115 Interacts with the GLUT4 vesicle protein, IRAP, and plays a critical role in insulin-stimulated GLUT4 translocation." *Mol Biol Cell* **16**(6): 2882-90.
- Hosono, R. and Y. Kamiya (1991). "Additional genes which result in an elevation of acetylcholine levels by mutations in *Caenorhabditis elegans*." *Neurosci Lett* **128**(2): 243-4.
- Hsieh, C. E., A. Leith, et al. (2006). "Towards high-resolution three-dimensional imaging of native mammalian tissue: electron tomography of frozen-hydrated rat liver sections." *J Struct Biol* **153**(1): 1-13.

- Hsiung, F., F. A. Ramirez-Weber, et al. (2005). "Dependence of Drosophila wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic." *Nature* **437**(7058): 560-3.
- Hsu, S. C., D. TerBush, et al. (2004). "The exocyst complex in polarized exocytosis." *Int Rev Cytol* **233**: 243-65.
- Hu, K., J. Carroll, et al. (2002). "Vesicular restriction of synaptobrevin suggests a role for calcium in membrane fusion." *Nature* **415**(6872): 646-50.
- Hu, K., J. Carroll, et al. (2002). "Action of complexin on SNARE complex." *J Biol Chem* **277**(44): 41652-6.
- Hua, W., D. Sheff, et al. (2006). "Vectorial insertion of apical and basolateral membrane proteins in polarized epithelial cells revealed by quantitative 3D live cell imaging." *J Cell Biol* **172**(7): 1035-44.
- Huang, X., N. Zhao, et al. (2004). "Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host." *Res Microbiol* **155**(10): 811-6.
- Huber, L. A., I. Fialka, et al. (2000). "Both calmodulin and the unconventional myosin Myr4 regulate membrane trafficking along the recycling pathway of MDCK cells." *Traffic* **1**(6): 494-503.
- Huber, L. A., S. Pimplikar, et al. (1993). "Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane." *J Cell Biol* **123**(1): 35-45.
- Humeau, Y., F. Doussau, et al. (2000). "How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release." *Biochimie* **82**(5): 427-46.
- Hunt, J. M., K. Bommert, et al. (1994). "A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion." *Neuron* **12**(6): 1269-79.
- Hunt, R. C., A. Dewey, et al. (1989). "Transferrin receptors on the surfaces of retinal pigment epithelial cells are associated with the cytoskeleton." *J Cell Sci* **92** (Pt 4): 655-66.
- Hunziker, W. and C. Fumey (1994). "A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells." *Embo J* **13**(13): 2963-9.
- Hunziker, W., C. Harter, et al. (1991). "Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant." *Cell* **66**(5): 907-20.
- Hunziker, W. and P. J. Peters (1998). "Rab17 localizes to recycling endosomes and regulates receptor-mediated transcytosis in epithelial cells." *J Biol Chem* **273**(25): 15734-41.
- Hurtado-Lorenzo, A., M. Skinner, et al. (2006). "V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway." *Nat Cell Biol* **8**(2): 124-36.
- Huss, M., G. Ingenhorst, et al. (2002). "Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c." *J Biol Chem* **277**(43): 40544-8.
- Hussain, M. M., S. Fatma, et al. (2005). "Intestinal lipoprotein assembly." *Curr Opin Lipidol* **16**(3): 281-5.
- Huttnner, W. B. and C. G. Dotti (1991). "Exocytotic and endocytotic membrane traffic in neurons." *Curr Opin Neurobiol* **1**(3): 388-92.
- Ihara, K., S. Watanabe, et al. (1997). "Identification of proteolipid from an extremely halophilic archaeon Halobacterium salinarum as an N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide binding subunit of ATP synthase." *Arch Biochem Biophys* **341**(2): 267-72.
- Ihrke, G., G. V. Martin, et al. (1998). "Apical plasma membrane proteins and endolyn-78 travel through a subapical compartment in polarized WIF-B hepatocytes." *J Cell Biol* **141**(1): 115-33.
- Iida, T., S. Kanai, et al. (1997). "Alpha- and beta-subunits of a V-type membrane ATPase in a hyperthermophilic sulfur-dependent archaeum, Thermococcus sp. KI." *Biochim Biophys Acta* **1329**(1): 12-7.
- Iida, T., H. Ohno, et al. (2000). "Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells." *J Immunol* **165**(9): 5062-8.
- Imai-Senga, Y., G. H. Sun-Wada, et al. (2002). "A human gene, ATP6E1, encoding a testis-specific isoform of H(+)-ATPase subunit E." *Gene* **289**(1-2): 7-12.
- Imamura, H., M. Nakano, et al. (2003). "Evidence for rotation of V1-ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2312-5.
- Imamura, H., M. Takeda, et al. (2005). "Rotation scheme of V1-motor is different from that of F1-motor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(50): 17929-33.
- Incardona, J. P. (2005). "From sensing cellular sterols to assembling sensory structures." *Dev Cell* **8**(6): 798-9.
- Incardona, J. P., J. H. Lee, et al. (2000). "Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22): 12044-9.
- Ingham, P. W. and A. P. McMahon (2001). "Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles." *Genes Dev* **15**(23): 3059-87.
- Inoue, T., Y. Wang, et al. (2005). "Structure and regulation of the V-ATPases." *J Bioenerg Biomembr* **37**(6): 393-8.
- Inoue, T., S. Wilkens, et al. (2003). "Subunit structure, function, and arrangement in the yeast and coated vesicle V-ATPases." *J Bioenerg Biomembr* **35**(4): 291-9.
- Ishiki, M. and A. Klip (2005). "Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners." *Endocrinology* **146**(12): 5071-8.
- Israel, M., B. Lesbats, et al. (1988). "Is the acetylcholine releasing protein mediatophore present in rat brain?" *FEBS Lett* **233**(2): 421-6.
- Israel, M., N. Morel, et al. (1986). "Purification of a presynaptic membrane protein that mediates a calcium-dependent translocation of acetylcholine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(23): 9226-30.
- Issandou, M., R. Guillard, et al. (2004). "Up-regulation of low-density lipoprotein receptor in human hepatocytes is induced by sequestration of free cholesterol in the endosomal/lysosomal compartment." *Biochem Pharmacol* **67**(12): 2281-9.
- Izumi, H., T. Torigoe, et al. (2003). "Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy." *Cancer Treat Rev* **29**(6): 541-9.
- Jacob, R., M. Alfallah, et al. (2000). "Structural determinants required for apical sorting of an intestinal brush-border membrane protein." *J Biol Chem* **275**(9): 6566-72.
- Jager, D., E. Stockert, et al. (2000). "Serological cloning of a melanocyte rab guanosine 5'-triphosphate-binding protein and a chromosome condensation protein from a melanoma complementary DNA library." *Cancer Res* **60**(13): 3584-91.
- Jahn, R., T. Lang, et al. (2003). "Membrane fusion." *Cell* **112**(4): 519-33.
- Jahn, R. and R. H. Scheller (2006). "SNAREs - engines for membrane fusion." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(9): 631-43.
- Jaisser, F. (1996). "[Molecular and functional diversity of NA,K-ATPase and renal H,K-ATPases]." *Nephrologie* **17**(7): 401-8.
- Jang, S. B., Y. G. Kim, et al. (2002). "Crystal structure of SEDL and its implications for a genetic disease spondyloepiphyseal dysplasia tarda." *J Biol Chem* **277**(51): 49863-9.
- Jansen, E. J., J. C. Holthuis, et al. (1998). "Intracellular trafficking of the vacuolar H+-ATPase accessory subunit Ac45." *J Cell Sci* **111** (Pt 20): 2999-3006.

- Jantsch-Plunger, V. and M. Glotzer (1999). "Depletion of syntaxins in the early *Caenorhabditis elegans* embryo reveals a role for membrane fusion events in cytokinesis." *Curr Biol* **9**(14): 738-45.
- Jekely, G. (2003). "Small GTPases and the evolution of the eukaryotic cell." *Bioessays* **25**(11): 1129-38.
- Jena, B. P. (2002). "Fusion pore in live cells." *News Physiol Sci* **17**: 219-22.
- Jena, B. P. (2003). "Fusion pore or porosome: structure and dynamics." *J Endocrinol* **176**(2): 169-74.
- Jeong, J. and A. P. McMahon (2002). "Cholesterol modification of Hedgehog family proteins." *J Clin Invest* **110**(5): 591-6.
- Ji, Y. J., K. Y. Choi, et al. (2006). "VHA-8, the E subunit of V-ATPase, is essential for pH homeostasis and larval development in *C. elegans*." *FEBS Lett* **580**(13): 3161-6.
- Jiang, S., H. K. Avraham, et al. (2006). "Receptor-type PTP-NP inhibition of Dynamin-1 GTPase activity is associated with neuronal depolarization." *Cell Signal* **18**(9): 1439-46.
- Johannes, L., P. M. Lledo, et al. (1994). "The GTPase Rab3a negatively controls calcium-dependent exocytosis in neuroendocrine cells." *Embo J* **13**(9): 2029-37.
- Johansson, M., M. Lehto, et al. (2005). "The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and alters functional properties of late endocytic compartments." *Mol Biol Cell* **16**(12): 5480-92.
- Johnston, R. J. and O. Hobert (2003). "A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **426**(6968): 845-9.
- Johnston, R. J., Jr., S. Chang, et al. (2005). "MicroRNAs acting in a double-negative feedback loop to control a neuronal cell fate decision." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(35): 12449-54.
- Johnstone, I. L. and J. D. Barry (1996). "Temporal reiteration of a precise gene expression pattern during nematode development." *Embo J* **15**(14): 3633-9.
- Johnstone, R. M., M. Adam, et al. (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." *J Biol Chem* **262**(19): 9412-20.
- Johnstone, R. M. and J. Ahn (1990). "A common mechanism may be involved in the selective loss of plasma membrane functions during reticulocyte maturation." *Biomed Biochim Acta* **49**(2-3): S70-5.
- Jones, R. P., L. J. Durose, et al. (2005). "Defined sites of interaction between subunits E (Vma4p), C (Vma5p), and G (Vma10p) within the stator structure of the vacuolar H+-ATPase." *Biochemistry* **44**(10): 3933-41.
- Jones, S., C. Newman, et al. (2000). "The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32." *Mol Biol Cell* **11**(12): 4403-11.
- Jones, S. J. and D. L. Baillie (1995). "Characterization of the let-653 gene in *Caenorhabditis elegans*." *Mol Gen Genet* **248**(6): 719-26.
- Jordens, I., M. Fernandez-Borja, et al. (2001). "The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors." *Curr Biol* **11**(21): 1680-5.
- Jordens, I., M. Marsman, et al. (2005). "Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion." *Traffic* **6**(12): 1070-7.
- Jouret, F., C. Auzanneau, et al. (2005). "Ubiquitous and kidney-specific subunits of vacuolar H+-ATPase are differentially expressed during nephrogenesis." *J Am Soc Nephrol* **16**(11): 3235-46.
- Kaeser, P. S. and T. C. Sudhof (2005). "RIM function in short- and long-term synaptic plasticity." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6): 1345-9.
- Kajiya, H., F. Okamoto, et al. (2003). "Calcitonin inhibits proton extrusion in resorbing rat osteoclasts via protein kinase A." *Pflugers Arch* **445**(6): 651-8.
- Kakinuma, Y., S. Kakinuma, et al. (1993). "A gene encoding the 16-kDa proteolipid subunit of *Enterococcus hirae* Na(+)-ATPase complex." *Biochem Biophys Res Commun* **195**(2): 1063-9.
- Kakinuma, Y., I. Yamato, et al. (1999). "Structure and function of vacuolar Na+-translocating ATPase in *Enterococcus hirae*." *J Bioenerg Biomembr* **31**(1): 7-14.
- Kanaya, S. and D. Fujimoto (1973). "Letter: Fragments of polyproline-like structure from a structural protein, cuticlin." *J Mol Biol* **81**(3): 415-8.
- Kane, P. M. (1995). "Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase in vivo." *J Biol Chem* **270**(28): 17025-32.
- Kane, P. M. (1999). "Biosynthesis and regulation of the yeast vacuolar H+-ATPase." *J Bioenerg Biomembr* **31**(1): 49-56.
- Kane, P. M. (2000). "Regulation of V-ATPases by reversible disassembly." *FEBS Lett* **469**(2-3): 137-41.
- Kane, P. M. (2005). "Close-up and genomic views of the yeast vacuolar H+-ATPase." *J Bioenerg Biomembr* **37**(6): 399-403.
- Kane, P. M. (2006). "The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H+-ATPase." *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(1): 177-91.
- Kane, P. M. and K. J. Parra (2000). "Assembly and regulation of the yeast vacuolar H(+)-ATPase." *J Exp Biol* **203**(Pt 1): 81-7.
- Kane, P. M. and A. M. Smardon (2003). "Assembly and regulation of the yeast vacuolar H+-ATPase." *J Bioenerg Biomembr* **35**(4): 313-21.
- Kane, P. M., M. Tarsio, et al. (1999). "Early steps in assembly of the yeast vacuolar H+-ATPase." *J Biol Chem* **274**(24): 17275-83.
- Kane, P. M., C. T. Yamashiro, et al. (1990). "Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase." *Science* **250**(4981): 651-7.
- Kapsogeorgou, E. K., R. F. Abu-Helu, et al. (2005). "Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins." *Arthritis Rheum* **52**(5): 1517-21.
- Karet, F. E. (2005). "Physiological and metabolic implications of V-ATPase isoforms in the kidney." *J Bioenerg Biomembr* **37**(6): 425-9.
- Kato, M., T. Sasaki, et al. (1996). "Physical and functional interaction of rabphilin-3A with alpha-actinin." *J Biol Chem* **271**(50): 31775-8.
- Katoh, F., S. Hyodo, et al. (2003). "Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branchial mitochondria-rich cells of killifish *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment." *J Exp Biol* **206**(Pt 5): 793-803.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi, et al. (2002). "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12): 893-905.
- Katzmann, D. J., C. J. Stefan, et al. (2003). "Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting." *J Cell Biol* **162**(3): 413-23.
- Kawakami, T., T. Kawcak, et al. (2002). "Mouse dispatched mutants fail to distribute hedgehog proteins and are defective in hedgehog signaling." *Development* **129**(24): 5753-65.
- Kawamura, Y., K. Arakawa, et al. (2000). "Tissue specificity of E subunit isoforms of plant vacuolar H(+)-ATPase and existence of isotype enzymes." *J Biol Chem* **275**(9): 6515-22.

- Kawamura, Y., K. Arakawa, et al. (2001). "ATP analogue binding to the A subunit induces conformational changes in the E subunit that involves a disulfide bond formation in plant V-ATPase." *Eur J Biochem* **268**(10): 2801-9.
- Kawasaki-Nishi, S., K. Bowers, et al. (2001). "The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis." *J Biol Chem* **276**(50): 47411-20.
- Kawasaki-Nishi, S., T. Nishi, et al. (2001). "Arg-735 of the 100-kDa subunit a of the yeast V-ATPase is essential for proton translocation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12397-402.
- Kawasaki-Nishi, S., T. Nishi, et al. (2001). "Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa a-subunit differ in coupling efficiency and in vivo dissociation." *J Biol Chem* **276**(21): 17941-8.
- Kawasaki-Nishi, S., T. Nishi, et al. (2003). "Interacting helical surfaces of the transmembrane segments of subunits a and c' of the yeast V-ATPase defined by disulfide-mediated cross-linking." *J Biol Chem* **278**(43): 41908-13.
- Keenan Curtiss, K. and P. M. Kane (2002). "Novel vacuolar H⁺-ATPase complexes resulting from overproduction of Vma5p and Vma13p." *J Biol Chem* **277**(4): 2716-24.
- Keller, P. and K. Simons (1998). "Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin." *J Cell Biol* **140**(6): 1357-67.
- Kettner, C., A. Bertl, et al. (2003). "Electrophysiological analysis of the yeast V-type proton pump: variable coupling ratio and proton shunt." *Biophys J* **85**(6): 3730-8.
- Keyel, P. A. and L. M. Traub (2004). "Clathrin: now you see me, now you don't!" *Dev Cell* **7**(3): 283-4.
- Khvotchev, M. V., M. Ren, et al. (2003). "Divergent functions of neuronal Rab11b in Ca²⁺-regulated versus constitutive exocytosis." *J Neurosci* **23**(33): 10531-9.
- Kibak, H., L. Taiz, et al. (1992). "Evolution of structure and function of V-ATPases." *J Bioenerg Biomembr* **24**(4): 415-24.
- Kiessling, V. and L. K. Tamm (2003). "Measuring distances in supported bilayers by fluorescence interference-contrast microscopy: polymer supports and SNARE proteins." *Biophys J* **84**(1): 408-18.
- Kim, B. Y., M. Ueda, et al. (2003). "Identification of mouse Vps16 and biochemical characterization of mammalian class C Vps complex." *Biochem Biophys Res Commun* **311**(3): 577-82.
- Kim, Y. G., E. J. Sohn, et al. (2005). "Crystal structure of bet3 reveals a novel mechanism for Golgi localization of tethering factor TRAPP." *Nat Struct Mol Biol* **12**(1): 38-45.
- Kiontke, K. and D. H. A. Fitch (2005). The Phylogenetic relationships of Caenorhabditis and other rhabditids. *Wormbook*. e. T. C. e. R. C. Wormbook, doi/10.1895/wormbook.1.11.1, <http://www.wormbook.org>.
- Kirchhausen, T. (1999). "Cell biology. Boa constrictor or rattlesnake?" *Nature* **398**(6727): 470-1.
- Kirchhausen, T. (2000). "Clathrin." *Annu Rev Biochem* **69**: 699-727.
- Kissmehl, R., M. Froissard, et al. (2002). "NSF regulates membrane traffic along multiple pathways in Paramecium." *J Cell Sci* **115**(Pt 20): 3935-46.
- Klein, T. J. and M. Mlodzik (2005). "Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 155-76.
- Klein, U., M. Timme, et al. (1997). "The H⁺ pump in frog skin (*Rana esculenta*): identification and localization of a V-ATPase." *J Membr Biol* **157**(2): 117-26.
- Kluge, C., T. Seidel, et al. (2004). "Subcellular distribution of the V-ATPase complex in plant cells, and in vivo localisation of the 100 kDa subunit VHA-a within the complex." *BMC Cell Biol* **5**: 29.
- Klyachko, V. A. and M. B. Jackson (2002). "Capacitance steps and fusion pores of small and large-dense-core vesicles in nerve terminals." *Nature* **418**(6893): 89-92.
- Knecht, V. and H. Grubmüller (2003). "Mechanical coupling via the membrane fusion SNARE protein syntaxin 1A: a molecular dynamics study." *Biophys J* **84**(3): 1527-47.
- Kobayashi, T., M. H. Beuchat, et al. (1999). "Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport." *Nat Cell Biol* **1**(2): 113-8.
- Kobayashi, T. and Y. Hirabayashi (2000). "Lipid membrane domains in cell surface and vacuolar systems." *Glycoconj J* **17**(3-4): 163-71.
- Kobayashi, T., E. Stang, et al. (1998). "A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function." *Nature* **392**(6672): 193-7.
- Koh, T. W. and H. J. Bellen (2003). "Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release." *Trends Neurosci* **26**(8): 413-22.
- Komada, M. and P. Soriano (1999). "Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis." *Genes Dev* **13**(11): 1475-85.
- Kondylis, V. and C. Rabouille (2003). "A novel role for dp115 in the organization of tER sites in Drosophila." *J Cell Biol* **162**(2): 185-98.
- Kontani, K., I. P. Moskowitz, et al. (2005). "Repression of cell-cell fusion by components of the *C. elegans* vacuolar ATPase complex." *Dev Cell* **8**(5): 787-94.
- Kontani, K. and J. H. Rothman (2005). "Cell fusion: EFF is enough." *Curr Biol* **15**(7): R252-4.
- Kornak, U., A. Schulz, et al. (2000). "Mutations in the a3 subunit of the vacuolar H(+)-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis." *Hum Mol Genet* **9**(13): 2059-63.
- Kostrouchova, M., M. Krause, et al. (2001). "Nuclear hormone receptor CHR3 is a critical regulator of all four larval molts of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7360-5.
- Kozlov, M. M. and L. V. Chernomordik (2002). "The protein coat in membrane fusion: lessons from fission." *Traffic* **3**(4): 256-67.
- Kreitzer, G., A. Marmorstein, et al. (2000). "Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein." *Nat Cell Biol* **2**(2): 125-7.
- Kreitzer, G., J. Schmoranz, et al. (2003). "Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells." *Nat Cell Biol* **5**(2): 126-36.
- Kroschewski, R., A. Hall, et al. (1999). "Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells." *Nat Cell Biol* **1**(1): 8-13.
- Kruth, H. S., N. L. Jones, et al. (2005). "Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein." *J Biol Chem* **280**(3): 2352-60.
- Ktistakis, N. T., H. A. Brown, et al. (1996). "Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles." *J Cell Biol* **134**(2): 295-306.
- Kuge, O., C. Dascher, et al. (1994). "Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments." *J Cell Biol* **125**(1): 51-65.

- Kundra, R. and S. Kornfeld (1999). "Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis." *J Biol Chem* **274**(43): 31039-46.
- Kuo, A., C. Zhong, et al. (2000). "Transmembrane transforming growth factor-alpha tethers to the PDZ domain-containing, Golgi membrane-associated protein p59/GRASP55." *Embo J* **19**(23): 6427-39.
- Kurashima, K., M. Numata, et al. (1996). "The role of vacuolar H(+)-ATPase in the control of intragranular pH and exocytosis in eosinophils." *Lab Invest* **75**(5): 689-98.
- Kurz, C. L. and N. Pujol (2002). "C. elegans : des montagnes de données." *Med. Sci.* **18**: 97-9.
- Kurzchalia, T. V. and S. Ward (2003). "Why do worms need cholesterol?" *Nat Cell Biol* **5**(8): 684-8.
- Kuwabara, P. E. and M. Labouesse (2002). "The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role?" *Trends Genet* **18**(4): 193-201.
- Kuwabara, P. E., M. H. Lee, et al. (2000). "A C. elegans patched gene, ptc-1, functions in germ-line cytokinesis." *Genes Dev* **14**(15): 1933-44.
- Kweon, D. H., C. S. Kim, et al. (2002). "The membrane-dipped neuronal SNARE complex: a site-directed spin labeling electron paramagnetic resonance study." *Biochemistry* **41**(29): 9264-8.
- Kweon, D. H., Y. K. Shin, et al. (2006). "Membrane topology of helix 0 of the Epsin N-terminal homology domain." *Mol Cells* **21**(3): 428-35.
- Laage, R., J. Rohde, et al. (2000). "A conserved membrane-spanning amino acid motif drives homomeric and supports heteromeric assembly of presynaptic SNARE proteins." *J Biol Chem* **275**(23): 17481-7.
- Ladinsky, M. S., J. R. Kremer, et al. (1994). "HVEM tomography of the trans-Golgi network: structural insights and identification of a lace-like vesicle coat." *J Cell Biol* **127**(1): 29-38.
- Ladinsky, M. S., C. C. Wu, et al. (2002). "Structure of the Golgi and distribution of reporter molecules at 20 degrees C reveals the complexity of the exit compartments." *Mol Biol Cell* **13**(8): 2810-25.
- Lall, S., D. Grun, et al. (2006). "A genome-wide map of conserved microRNA targets in C. elegans." *Curr Biol* **16**(5): 460-71.
- Landoit-Marticorena, C., W. H. Kahr, et al. (1999). "Substrate- and inhibitor-induced conformational changes in the yeast V-ATPase provide evidence for communication between the catalytic and proton-translocating sectors." *J Biol Chem* **274**(37): 26057-64.
- Lang, T., D. Bruns, et al. (2001). "SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis." *Embo J* **20**(9): 2202-13.
- Lang, T., M. Margittai, et al. (2002). "SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs." *J Cell Biol* **158**(4): 751-60.
- Langford, G. M. (2002). "Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport." *Traffic* **3**(12): 859-65.
- Larkin, J. M., B. Woo, et al. (2000). "Rab3D, a small GTP-binding protein implicated in regulated secretion, is associated with the transcytotic pathway in rat hepatocytes." *Hepatology* **32**(2): 348-56.
- Lassandro, F., M. Sebastiani, et al. (1994). "The role of dityrosine formation in the crosslinking of CUT-2, the product of a second cuticlin gene of *Caenorhabditis elegans*." *Mol Biochem Parasitol* **65**(1): 147-59.
- Laulagnier, K., C. Motta, et al. (2004). "Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization." *Biochem J* **380**(Pt 1): 161-71.
- Lazar, T., M. Gotte, et al. (1997). "Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell?" *Trends Biochem Sci* **22**(12): 468-72.
- Le Bivic, A., Y. Sambuy, et al. (1991). "An internal deletion in the cytoplasmic tail reverses the apical localization of human NGF receptor in transfected MDCK cells." *J Cell Biol* **115**(3): 607-18.
- Leabu, M. (2006). "Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanisms." *J Cell Mol Med* **10**(2): 423-7.
- Lebrand, C., M. Corti, et al. (2002). "Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7." *Embo J* **21**(6): 1289-300.
- Lee, B. S., S. L. Gluck, et al. (1999). "Interaction between vacuolar H(+)-ATPase and microfilaments during osteoclast activation." *J Biol Chem* **274**(41): 29164-71.
- Lee, I., M. A. Skinner, et al. (2004). "Expression of the vacuolar H+-ATPase 16-kDa subunit results in the Triton X-100-insoluble aggregation of beta1 integrin and reduction of its cell surface expression." *J Biol Chem* **279**(51): 53007-14.
- Lee, J. and B. R. Lenz (1997). "Evolution of lipidic structures during model membrane fusion and the relation of this process to cell membrane fusion." *Biochemistry* **36**(21): 6251-9.
- Lee, M. C., E. A. Miller, et al. (2004). "Bi-directional protein transport between the ER and Golgi." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 87-123.
- Lee, M. C., L. Orci, et al. (2005). "Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle." *Cell* **122**(4): 605-17.
- Leroy, C., F. M. Meunier, et al. (1994). "In vitro expression of the 15 kDa subunit of the mediophore and functional reconstitution of acetylcholine release." *Gen Pharmacol* **25**(2): 245-55.
- Lesa, G. M., J. Seemann, et al. (2000). "The amino-terminal domain of the golgi protein giantin interacts directly with the vesicle-tethering protein p115." *J Biol Chem* **275**(4): 2831-6.
- Leung, S. M., W. G. Ruiz, et al. (2000). "Sorting of membrane and fluid at the apical pole of polarized Madin-Darby canine kidney cells." *Mol Biol Cell* **11**(6): 2131-50.
- Levy, E. and M. Bendayan (2000). "Use of immunoelectron microscopy and intestinal models to explore the elaboration of apolipoproteins required for intraenterocyte lipid transport." *Microsc Res Tech* **49**(4): 374-82.
- Levy, E., M. Mehran, et al. (1995). "Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion." *Faseb J* **9**(8): 626-35.
- Li, C., K. Takei, et al. (1994). "Synaptic targeting of rabphilin-3A, a synaptic vesicle Ca2+/phospholipid-binding protein, depends on rab3A/3C." *Neuron* **13**(4): 885-98.
- Li, Y. P., W. Chen, et al. (1999). "Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification." *Nat Genet* **23**(4): 447-51.
- Liegeois, S., A. Benedetto, et al. (2006). "The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*." *J Cell Biol* **173**(6): 949-61.
- Lievens, P. M., C. Tufarelli, et al. (1997). "CASP, a novel, highly conserved alternative-splicing product of the CDP/cut/cux gene, lacks cut-repeat and homeo DNA-binding domains, and interacts with full-length CDP in vitro." *Gene* **197**(1-2): 73-81.
- Lin, R. C. and R. H. Scheller (1997). "Structural organization of the synaptic exocytosis core complex." *Neuron* **19**(5): 1087-94.
- Lin, X. P., N. Almqvist, et al. (2005). "Human small intestinal epithelial cells constitutively express the key elements for antigen processing and the production of exosomes." *Blood Cells Mol Dis* **35**(2): 122-8.
- Linial, M. (1997). "SNARE proteins--why so many, why so few?" *J Neurochem* **69**(5): 1781-92.

- Linstedt, A. D., S. A. Jesch, et al. (2000). "Binding relationships of membrane tethering components. The giantin N terminus and the GM130 N terminus compete for binding to the p115 C terminus." *J Biol Chem* **275**(14): 10196-201.
- Lisanti, M. P., I. W. Caras, et al. (1989). "A glycoprophospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells." *J Cell Biol* **109**(5): 2145-56.
- Lisanti, M. P., M. Sargiacomo, et al. (1988). "Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(24): 9557-61.
- Liu, Q., P. M. Kane, et al. (1996). "Site-directed mutagenesis of the yeast V-ATPase B subunit (Vma2p)." *J Biol Chem* **271**(4): 2018-22.
- Liu, Q., X. H. Leng, et al. (1997). "Site-directed mutagenesis of the yeast V-ATPase A subunit." *J Biol Chem* **272**(18): 11750-6.
- Liu, T., C. Mirschberger, et al. (2002). "Altered expression of the 100 kDa subunit of the Dictyostelium vacuolar proton pump impairs enzyme assembly, endocytic function and cytosolic pH regulation." *J Cell Sci* **115**(Pt 9): 1907-18.
- Liu, T. F., G. Kandala, et al. (2001). "PDZ domain protein GIPC interacts with the cytoplasmic tail of melanosomal membrane protein gp75 (tyrosinase-related protein-1)." *J Biol Chem* **276**(38): 35768-77.
- Liu, Y. and C. Barlowe (2002). "Analysis of Sec22p in endoplasmic reticulum/Golgi transport reveals cellular redundancy in SNARE protein function." *Mol Biol Cell* **13**(9): 3314-24.
- Lledo, P. M., L. Johannes, et al. (1994). "Rab3 proteins: key players in the control of exocytosis." *Trends Neurosci* **17**(10): 426-32.
- Lledo, P. M., P. Vernier, et al. (1993). "Inhibition of Rab3B expression attenuates Ca(2+)-dependent exocytosis in rat anterior pituitary cells." *Nature* **364**(6437): 540-4.
- Lloyd, T. E., R. Atkinson, et al. (2002). "Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in Drosophila." *Cell* **108**(2): 261-9.
- Lock, J. G. and J. L. Stow (2005). "Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin." *Mol Biol Cell* **16**(4): 1744-55.
- Loguidice, L. and G. Matthews (2006). "The synaptic vesicle cycle: is kissing overrated?" *Neuron* **51**(6): 676-7.
- Loh, E., F. Peter, et al. (2005). "Mammalian Bet3 functions as a cytosolic factor participating in transport from the ER to the Golgi apparatus." *J Cell Sci* **118**(Pt 6): 1209-22.
- Lokanath, N. K., Y. Ukita, et al. (2005). "Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the vacuole-type ATPase subunit E from Pyrococcus horikoshii OT3." *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61**(Pt 1): 56-8.
- Lolkema, J. S., Y. Chaban, et al. (2003). "Subunit composition, structure, and distribution of bacterial V-type ATPases." *J Bioenerg Biomembr* **35**(4): 323-35.
- Lollike, K., N. Borregaard, et al. (1995). "The exocytotic fusion pore of small granules has a conductance similar to an ion channel." *J Cell Biol* **129**(1): 99-104.
- Lowe, M. (2000). "Membrane transport: tethers and TRAPPs." *Curr Biol* **10**(11): R407-9.
- Lu, M., L. S. Holliday, et al. (2001). "Interaction between aldolase and vacuolar H+-ATPase: evidence for direct coupling of glycolysis to the ATP-hydrolyzing proton pump." *J Biol Chem* **276**(32): 30407-13.
- Lu, M., Y. Y. Sautin, et al. (2004). "The glycolytic enzyme aldolase mediates assembly, expression, and activity of vacuolar H+-ATPase." *J Biol Chem* **279**(10): 8732-9.
- Lu, M., S. Vergara, et al. (2002). "The amino-terminal domain of the E subunit of vacuolar H(+)-ATPase (V-ATPase) interacts with the H subunit and is required for V-ATPase function." *J Biol Chem* **277**(41): 38409-15.
- Lu, X., W. Qin, et al. (2005). "The growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma xenografts are inhibited by small interfering RNA targeting to the subunit ATP6L of proton pump." *Cancer Res* **65**(15): 6843-9.
- Lucic, V., F. Forster, et al. (2005). "Structural studies by electron tomography: from cells to molecules." *Annu Rev Biochem* **74**: 833-65.
- Luzio, J. P., B. M. Mullock, et al. (2001). "Relationship between endosomes and lysosomes." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 4): 476-80.
- Luzio, J. P., P. R. Pryor, et al. (2005). "Membrane traffic to and from lysosomes." *Biochem Soc Symp*(72): 77-86.
- Lyubchenko, T. A., G. A. Wurth, et al. (2001). "Role of calcium influx in cytotoxic T lymphocyte lytic granule exocytosis during target cell killing." *Immunity* **15**(5): 847-59.
- Ma, Y., A. Erkner, et al. (2002). "Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched." *Cell* **111**(1): 63-75.
- MacLeod, K. J., E. Vasilyeva, et al. (1998). "Mutational analysis of the nucleotide binding sites of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase." *J Biol Chem* **273**(1): 150-6.
- Maegawa, Y., H. Morita, et al. (2006). "Structure of the catalytic nucleotide-binding subunit A of A-type ATP synthase from Pyrococcus horikoshii reveals a novel domain related to the peripheral stalk." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(Pt 5): 483-8.
- Malhotra, V., L. Orci, et al. (1988). "Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack." *Cell* **54**(2): 221-7.
- Malikova, M., J. Shi, et al. (2004). "V-type ATPase is involved in biogenesis of GLUT4 vesicles." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**(3): E547-52.
- Malkus, P., L. A. Graham, et al. (2004). "Role of Vma21p in assembly and transport of the yeast vacuolar ATPase." *Mol Biol Cell* **15**(11): 5075-91.
- Mallard, F., B. L. Tang, et al. (2002). "Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform." *J Cell Biol* **156**(4): 653-64.
- Mallegol, J., G. van Niel, et al. (2005). "Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes." *Blood Cells Mol Dis* **35**(1): 11-6.
- Mallo, G. V., C. L. Kurz, et al. (2002). "Inducible antibacterial defense system in C. elegans." *Curr Biol* **12**(14): 1209-14.
- Malsam, J., A. Satoh, et al. (2005). "Golgin tethers define subpopulations of COPI vesicles." *Science* **307**(5712): 1095-8.
- Mammoto, A., T. Ohtsuka, et al. (1999). "Rab11BP/Rabphilin-11, a downstream target of rab11 small G protein implicated in vesicle recycling." *J Biol Chem* **274**(36): 25517-24.
- Mammoto, A., T. Sasaki, et al. (2000). "Physical and functional interaction of rabphilin-11 with mammalian Sec13 protein. Implication in vesicle trafficking." *J Biol Chem* **275**(18): 13167-70.
- Manolson, M. F., B. Wu, et al. (1994). "STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H(+)-ATPase subunit Vph1p." *J Biol Chem* **269**(19): 14064-74.
- Manolson, M. F., H. Yu, et al. (2003). "The a3 isoform of the 100-kDa V-ATPase subunit is highly but differentially expressed in large (>or=10 nuclei) and small (<or= nuclei) osteoclasts." *J Biol Chem* **278**(49): 49271-8.

- Mans, B. J., V. Anantharaman, et al. (2004). "Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex." *Cell Cycle* **3**(12): 1612-37.
- Margolles-Clark, E., K. Tenney, et al. (1999). "The structure of the vacuolar ATPase in *Neurospora crassa*." *J Bioenerg Biomembr* **31**(1): 29-37.
- Mariussen, E., J. Mørch Andersen, et al. (1999). "The effect of polychlorinated biphenyls on the uptake of dopamine and other neurotransmitters into rat brain synaptic vesicles." *Toxicol Appl Pharmacol* **161**(3): 274-82.
- Marmorstein, A. D. (2001). "The polarity of the retinal pigment epithelium." *Traffic* **2**(12): 867-72.
- Martin, T. F. and R. N. Grishanin (2003). "PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells." *Methods Cell Biol* **71**: 267-86.
- Martinez-Menarguez, J. A., H. J. Geuze, et al. (1999). "Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles." *Cell* **98**(1): 81-90.
- Martinez, I., S. Chakrabarti, et al. (2000). "Synaptotagmin VII regulates Ca(2+)-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts." *J Cell Biol* **148**(6): 1141-49.
- Martinez, O. and B. Goud (1998). "Rab proteins." *Biochim Biophys Acta* **1404**(1-2): 101-12.
- Marzesco, A. M., P. Janich, et al. (2005). "Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells." *J Cell Sci* **118**(Pt 13): 2849-58.
- Marzolo, M. P., P. Bull, et al. (1997). "Apical sorting of hepatitis B surface antigen (HBsAg) is independent of N-glycosylation and glycosylphosphatidylinositol-anchored protein segregation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1834-9.
- Marzolo, M. P., M. I. Yuseff, et al. (2003). "Differential distribution of low-density lipoprotein-receptor-related protein (LRP) and megalin in polarized epithelial cells is determined by their cytoplasmic domains." *Traffic* **4**(4): 273-88.
- Masson, D., P. J. Peters, et al. (1990). "Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH." *Biochemistry* **29**(51): 11229-35.
- Masson, J., C. Sagane, et al. (1999). "Neurotransmitter transporters in the central nervous system." *Pharmacol Rev* **51**(3): 439-64.
- Mata, L., O. W. Petersen, et al. (1986). "Endocytosis in guinea pig seminal vesicle epithelial cells cultivated in chemically defined medium." *Biol Cell* **58**(3): 211-9.
- Matsuo, H., J. Chevallier, et al. (2004). "Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization." *Science* **303**(5657): 531-4.
- Matsuoka, K., Y. Morimitsu, et al. (1998). "Coat assembly directs v-SNARE concentration into synthetic COPII vesicles." *Mol Cell* **2**(5): 703-8.
- Matsuoka, K., L. Orci, et al. (1998). "COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes." *Cell* **93**(2): 263-75.
- Matsuoka, K., R. Schekman, et al. (2001). "Surface structure of the COPII-coated vesicle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13705-9.
- Matter, K., W. Hunziker, et al. (1992). "Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants." *Cell* **71**(5): 741-53.
- Matyash, V., E. V. Entchev, et al. (2004). "Sterol-derived hormone(s) controls entry into diapause in *Caenorhabditis elegans* by consecutive activation of DAF-12 and DAF-16." *PLoS Biol* **2**(10): e280.
- Mayer, A. (2001). "What drives membrane fusion in eukaryotes?" *Trends Biochem Sci* **26**(12): 717-23.
- Mayer, A., W. Wickner, et al. (1996). "Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles." *Cell* **85**(1): 83-94.
- Mayor, S., K. G. Rothberg, et al. (1994). "Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking." *Science* **264**(5167): 1948-51.
- Mayran, N., R. G. Parton, et al. (2003). "Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells." *Embo J* **22**(13): 3242-53.
- McKechnie, N. M., D. Copland, et al. (2003). "Hr44 secreted with exosomes: loss from ciliary epithelium in response to inflammation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(6): 2650-6.
- McKeown, C., V. Praitis, et al. (1998). "sma-1 encodes a betaH-spectrin homolog required for *Caenorhabditis elegans* morphogenesis." *Development* **125**(11): 2087-98.
- McLauchlan, H., J. Newell, et al. (1998). "A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits." *Curr Biol* **8**(1): 34-45.
- McMahon, H. T. and I. G. Mills (2004). "COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches." *Curr Opin Cell Biol* **16**(4): 379-91.
- McMahon, H. T., M. Missler, et al. (1995). "Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function." *Cell* **83**(1): 111-9.
- McNeil, P. L. and R. A. Steinhardt (2003). "Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation." *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 697-731.
- McNew, J. A., M. Sogaard, et al. (1997). "Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport." *J Biol Chem* **272**(28): 17776-83.
- Medley, Q. G., N. Kedersha, et al. (1996). "Characterization of GMP-17, a granule membrane protein that moves to the plasma membrane of natural killer cells following target cell recognition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(2): 685-9.
- Mehta, P. P., E. Battenberg, et al. (1996). "SNAP-25 and synaptotagmin involvement in the final Ca(2+)-dependent triggering of neurotransmitter exocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(19): 10471-6.
- Melega, W. P. and B. D. Howard (1984). "Biochemical evidence that vesicles are the source of the acetylcholine released from stimulated PC12 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(20): 6535-8.
- Melikyan, G. B. and L. V. Chernomordik (1997). "Membrane rearrangements in fusion mediated by viral proteins." *Trends Microbiol* **5**(9): 349-55.
- Memon, A. R. (2004). "The role of ADP-ribosylation factor and SAR1 in vesicular trafficking in plants." *Biochim Biophys Acta* **1664**(1): 9-30.
- Menasche, G., E. Pastural, et al. (2000). "Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome." *Nat Genet* **25**(2): 173-6.
- Mendoza De Gives, P. M., K. G. Davies, et al. (1999). "Predatory behaviour of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes." *Parasitology* **119** (Pt 1): 95-104.
- Meresse, S., J. P. Gorvel, et al. (1995). "The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes." *J Cell Sci* **108** (Pt 11): 3349-58.

- Merrifield, C. J., D. Perraïs, et al. (2005). "Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells." *Cell* **121**(4): 593-606.
- Merris, M., W. G. Wadsworth, et al. (2003). "Sterol effects and sites of sterol accumulation in *Caenorhabditis elegans*: developmental requirement for 4alpha-methyl sterols." *J Lipid Res* **44**(1): 172-81.
- Meusser, B., C. Hirsch, et al. (2005). "ERAD: the long road to destruction." *Nat Cell Biol* **7**(8): 766-72.
- Michaux, G., A. Gansmuller, et al. (2000). "CHE-14, a protein with a sterol-sensing domain, is required for apical sorting in *C. elegans* ectodermal epithelial cells." *Curr Biol* **10**(18): 1098-107.
- Michaux, G., R. Legouis, et al. (2001). "Epithelial biology: lessons from *Caenorhabditis elegans*." *Gene* **277**(1-2): 83-100.
- Miele, A. E., P. J. Watson, et al. (2004). "Two distinct interaction motifs in amphiphysin bind two independent sites on the clathrin terminal domain beta-propeller." *Nat Struct Mol Biol* **11**(3): 242-8.
- Mignot, G., S. Roux, et al. (2006). "Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer." *J Cell Mol Med* **10**(2): 376-88.
- Mironov, A. A., G. V. Beznoussenko, et al. (2001). "Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae." *J Cell Biol* **155**(7): 1225-38.
- Mironov, A. A., A. A. Mironov, Jr., et al. (2003). "ER-to-Golgi carriers arise through direct en bloc protrusion and multistage maturation of specialized ER exit domains." *Dev Cell* **5**(4): 583-94.
- Mirre, C., L. Monlauzeur, et al. (1996). "Detergent-resistant membrane microdomains from Caco-2 cells do not contain caveolin." *Am J Physiol* **271**(3 Pt 1): C887-94.
- Mizuguchi, S., T. Uyama, et al. (2003). "Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **423**(6938): 443-8.
- Mogelsvang, S., B. J. Marsh, et al. (2004). "Predicting function from structure: 3D structure studies of the mammalian Golgi complex." *Traffic* **5**(5): 338-45.
- Mohler, W. A., G. Shemer, et al. (2002). "The type I membrane protein EFF-1 is essential for developmental cell fusion." *Dev Cell* **2**(3): 355-62.
- Monck, J. R., A. F. Oberhauser, et al. (1995). "The exocytotic fusion pore interface: a model of the site of neurotransmitter release." *Mol Membr Biol* **12**(1): 151-6.
- Montecucco, C. and G. Schiavo (1995). "Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins." *Q Rev Biophys* **28**(4): 423-72.
- Montecucco, C., G. Schiavo, et al. (2005). "SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close?" *Trends Biochem Sci* **30**(7): 367-72.
- Morel, N., J. C. Dedieu, et al. (2003). "Specific sorting of the a1 isoform of the V-H+-ATPase a subunit to nerve terminals where it associates with both synaptic vesicles and the presynaptic plasma membrane." *J Cell Sci* **116**(Pt 23): 4751-62.
- Morel, N., V. Gerard, et al. (1998). "Vacuolar H+-ATPase domains are transported separately in axons and assemble in Torpedo nerve endings." *J Neurochem* **71**(4): 1702-8.
- Morelli, A. E., A. T. Larregina, et al. (2004). "Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells." *Blood* **104**(10): 3257-66.
- Moribe, H., J. Yochim, et al. (2004). "Tetraspanin protein (TSP-15) is required for epidermal integrity in *Caenorhabditis elegans*." *J Cell Sci* **117**(Pt 22): 5209-20.
- Moriyama, Y. and M. Futai (1990). "H(+)-ATPase, a primary pump for accumulation of neurotransmitters, is a major constituent of brain synaptic vesicles." *Biochem Biophys Res Commun* **173**(1): 443-8.
- Moriyama, Y., M. Hayashi, et al. (2003). "Vacuolar proton pumps in malaria parasite cells." *J Bioenerg Biomembr* **35**(4): 367-75.
- Moriyama, Y., M. Maeda, et al. (1992). "The role of V-ATPase in neuronal and endocrine systems." *J Exp Biol* **172**: 171-8.
- Morsomme, P. and H. Riezman (2002). "The Rab GTPase Ypt1p and tethering factors couple protein sorting at the ER to vesicle targeting to the Golgi apparatus." *Dev Cell* **2**(3): 307-17.
- Moskalenko, S., D. O. Henry, et al. (2002). "The exocyst is a Ral effector complex." *Nat Cell Biol* **4**(1): 66-72.
- Moskalenko, S., C. Tong, et al. (2003). "Ral GTPases regulate exocyst assembly through dual subunit interactions." *J Biol Chem* **278**(51): 51743-8.
- Moss, J. and M. Vaughan (1998). "Molecules in the ARF orbit." *J Biol Chem* **273**(34): 21431-4.
- Mosessova, E., L. C. Bickford, et al. (2003). "SNARE selectivity of the COPII coat." *Cell* **114**(4): 483-95.
- Mostov, K. E., A. de Bruyn Kops, et al. (1986). "Deletion of the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor prevents basolateral localization and endocytosis." *Cell* **47**(3): 359-64.
- Mostov, K. E., M. Verges, et al. (2000). "Membrane traffic in polarized epithelial cells." *Curr Opin Cell Biol* **12**(4): 483-90.
- Motley, A., N. A. Bright, et al. (2003). "Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells." *J Cell Biol* **162**(5): 909-18.
- Moyer, B. D., B. B. Allan, et al. (2001). "Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis--Golgi tethering." *Traffic* **2**(4): 268-76.
- Muller, O., M. J. Bayer, et al. (2002). "The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V(0) trans-complex formation." *Embo J* **21**(3): 259-69.
- Muller, O., H. Neumann, et al. (2003). "Role of the Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking." *J Cell Sci* **116**(Pt 6): 1107-15.
- Mullock, B. M., N. A. Bright, et al. (1998). "Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent." *J Cell Biol* **140**(3): 591-601.
- Muniz, M., P. Morsomme, et al. (2001). "Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum." *Cell* **104**(2): 313-20.
- Muniz, M., C. Nuoffer, et al. (2000). "The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles." *J Cell Biol* **148**(5): 925-30.
- Muniz, M. and H. Riezman (2000). "Intracellular transport of GPI-anchored proteins." *Embo J* **19**(1): 10-5.
- Munro, S. (2005). "The Arf-like GTPase Arl1 and its role in membrane traffic." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 4): 601-5.
- Murata, T., I. Arechaga, et al. (2003). "The membrane domain of the Na+-motive V-ATPase from *Enterococcus hirae* contains a heptameric rotor." *J Biol Chem* **278**(23): 21162-7.
- Murata, T., K. Takase, et al. (1999). "Properties of the V0V1 Na+-ATPase from *Enterococcus hirae* and its V0 moiety." *J Biochem (Tokyo)* **125**(2): 414-21.
- Murata, T., I. Yamato, et al. (2005). "Structure and mechanism of vacuolar Na+-translocating ATPase from *Enterococcus hirae*." *J Bioenerg Biomembr* **37**(6): 411-3.
- Murata, T., Y. Yoshikawa, et al. (2002). "Nucleotide-binding sites in V-type Na+-ATPase from *Enterococcus hirae*." *J Biochem (Tokyo)* **132**(5): 789-94.
- Murata, Y., G. H. Sun-Wada, et al. (2002). "Differential localization of the vacuolar H+ pump with G subunit isoforms (G1 and G2) in mouse neurons." *J Biol Chem* **277**(39): 36296-303.

- Muriel, J. M., M. Brannan, et al. (2003). "M142.2 (cut-6), a novel *Caenorhabditis elegans* matrix gene important for dauer body shape." *Dev Biol* **260**(2): 339-51.
- Murk, J. L., B. M. Humbel, et al. (2003). "Endosomal compartmentalization in three dimensions: implications for membrane fusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13332-7.
- Musch, A., D. Cohen, et al. (2001). "cdc42 regulates the exit of apical and basolateral proteins from the trans-Golgi network." *Embo J* **20**(9): 2171-9.
- Musch, A., H. Xu, et al. (1996). "Transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface is signal mediated in polarized and nonpolarized cells." *J Cell Biol* **133**(3): 543-58.
- Myllyharju, J. and K. I. Kivirikko (2004). "Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms." *Trends Genet* **20**(1): 33-43.
- Myllyharju, J., L. Kukkola, et al. (2002). "The exoskeleton collagens in *Caenorhabditis elegans* are modified by prolyl 4-hydroxylases with unique combinations of subunits." *J Biol Chem* **277**(32): 29187-96.
- Nabi, I. R., A. Le Bipic, et al. (1991). "An endogenous MDCK lysosomal membrane glycoprotein is targeted basolaterally before delivery to lysosomes." *J Cell Biol* **115**(6): 1573-84.
- Naito, S. and T. Ueda (1983). "Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles." *J Biol Chem* **258**(2): 696-9.
- Nakagawa, T., M. Setou, et al. (2000). "A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex." *Cell* **103**(4): 569-81.
- Nakajima, H., A. Hirata, et al. (1991). "A cytoskeleton-related gene, uso1, is required for intracellular protein transport in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* **113**(2): 245-60.
- Nakamura, I., N. Takahashi, et al. (1997). "Lack of vacuolar proton ATPase association with the cytoskeleton in osteoclasts of osteosclerotic (oc/oc) mice." *FEBS Lett* **401**(2-3): 207-12.
- Nakamura, N., M. Lowe, et al. (1997). "The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner." *Cell* **89**(3): 445-55.
- Nakamura, N., A. Yamamoto, et al. (2000). "Syntaxin 7 mediates endocytic trafficking to late endosomes." *J Biol Chem* **275**(9): 6523-9.
- Nakano, A., D. Brada, et al. (1988). "A membrane glycoprotein, Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast." *J Cell Biol* **107**(3): 851-63.
- Nakano, A. and M. Muramatsu (1989). "A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus." *J Cell Biol* **109**(6 Pt 1): 2677-91.
- Nakano, Y., H. R. Kim, et al. (2004). "Inactivation of dispatched 1 by the chameleon mutation disrupts Hedgehog signalling in the zebrafish embryo." *Dev Biol* **269**(2): 381-92.
- Nelson, D. S., C. Alvarez, et al. (1998). "The membrane transport factor TAP/p115 cycles between the Golgi and earlier secretory compartments and contains distinct domains required for its localization and function." *J Cell Biol* **143**(2): 319-31.
- Nelson, F. K. and D. L. Riddle (1984). "Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery." *J Exp Zool* **231**(1): 45-56.
- Nelson, N. (1989). "Structure, molecular genetics, and evolution of vacuolar H⁺-ATPases." *J Bioenerg Biomembr* **21**(5): 553-71.
- Nelson, N. (1992). "Structural conservation and functional diversity of V-ATPases." *J Bioenerg Biomembr* **24**(4): 407-14.
- Nelson, N. (1992). "The vacuolar H(+)-ATPase--one of the most fundamental ion pumps in nature." *J Exp Biol* **172**: 19-27.
- Nelson, N. (1993). "Presynaptic events involved in neurotransmission." *J Physiol Paris* **87**(3): 171-8.
- Nelson, N. and W. R. Harvey (1999). "Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases." *Physiol Rev* **79**(2): 361-85.
- Nelson, N. and L. Taiz (1989). "The evolution of H⁺-ATPases." *Trends Biochem Sci* **14**(3): 113-6.
- Nemoto, T., R. Kimura, et al. (2001). "Sequential-replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic acini." *Nat Cell Biol* **3**(3): 253-8.
- Nemoto, T., T. Kojima, et al. (2004). "Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini." *J Biol Chem* **279**(36): 37544-50.
- Nevins, A. K. and D. C. Thurmond (2005). "A direct interaction between Cdc42 and vesicle-associated membrane protein 2 regulates SNARE-dependent insulin exocytosis." *J Biol Chem* **280**(3): 1944-52.
- Nichols, B. J., C. Ungermann, et al. (1997). "Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs." *Nature* **387**(6629): 199-202.
- Nielsen, E., F. Severin, et al. (1999). "Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules." *Nat Cell Biol* **1**(6): 376-82.
- Niikura, K., M. Takano, et al. (2004). "A novel inhibitor of vacuolar ATPase, FR167356, which can discriminate between osteoclast vacuolar ATPase and lysosomal vacuolar ATPase." *Br J Pharmacol* **142**(3): 558-66.
- Nishi, T. and M. Forgac (2000). "Molecular cloning and expression of three isoforms of the 100-kDa a subunit of the mouse vacuolar proton-translocating ATPase." *J Biol Chem* **275**(10): 6824-30.
- Nishi, T. and M. Forgac (2002). "The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(2): 94-103.
- Nishi, T., S. Kawasaki-Nishi, et al. (2001). "Expression and localization of the mouse homologue of the yeast V-ATPase 21-kDa Subunit c" (Vma16p)." *J Biol Chem* **276**(36): 34122-30.
- Nishimura, N. and W. E. Balch (1997). "A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum." *Science* **277**(5325): 556-8.
- Novick, P., C. Field, et al. (1980). "Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway." *Cell* **21**(1): 205-15.
- Nuoffer, C., H. W. Davidson, et al. (1994). "A GDP-bound of rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport between Golgi compartments." *J Cell Biol* **125**(2): 225-37.
- Ochotny, N. M., A. Van Vliet, et al. (2006). "Effects of human a3 and a4 mutations that result in osteopetrosis and distal renal tubular acidosis on yeast V-ATPase expression and activity." *J Biol Chem*.
- Odorizzi, G., M. Babst, et al. (1998). "Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body." *Cell* **95**(6): 847-58.
- Ogawa, H., S. Harada, et al. (1998). "Functional properties of the unc-64 gene encoding a *Caenorhabditis elegans* syntaxin." *J Biol Chem* **273**(4): 2192-8.
- Ogbureke, K. U., Q. Zhao, et al. (2005). "Human osteopetroses and the osteoclast V-H⁺-ATPase enzyme system." *Front Biosci* **10**: 2940-54.

- Ohira, M., A. M. Smardon, et al. (2006). "The E and G subunits of the yeast V-ATPase interact tightly and are both present at more than one copy per V1 complex." *J Biol Chem*
- Ohno, H., J. Stewart, et al. (1995). "Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins." *Science* **269**(5232): 1872-5.
- Ohno, H., T. Tomemori, et al. (1999). "Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells." *FEBS Lett* **449**(2-3): 215-20.
- Ohyu, T., T. Sasaki, et al. (1998). "Involvement of Rabphilin3 in endocytosis through interaction with Rabaptin5." *J Biol Chem* **273**(1): 613-7.
- Oishi, H., T. Sasaki, et al. (1996). "Interaction of both the C2A and C2B domains of rabphilin3 with Ca²⁺ and phospholipid." *Biochem Biophys Res Commun* **229**(2): 498-503.
- Oka, T. and M. Futai (2000). "Requirement of V-ATPase for ovulation and embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*." *J Biol Chem* **275**(38): 29556-61.
- Oka, T. and M. Krieger (2005). "Multi-component protein complexes and Golgi membrane trafficking." *J Biochem (Tokyo)* **137**(2): 109-14.
- Oka, T., Y. Murata, et al. (2001). "a4, a unique kidney-specific isoform of mouse vacuolar H⁺-ATPase subunit a." *J Biol Chem* **276**(43): 40050-4.
- Oka, T., T. Toyomura, et al. (2001). "Four subunit isoforms of *Caenorhabditis elegans* vacuolar H⁺-ATPase. Cell-specific expression during development." *J Biol Chem* **276**(35): 33079-85.
- Oka, T., R. Yamamoto, et al. (1997). "Three vha genes encode proteolipids of *Caenorhabditis elegans* vacuolar-type ATPase. Gene structures and preferential expression in an H-shaped excretory cell and rectal cells." *J Biol Chem* **272**(39): 24387-92.
- Oka, T., R. Yamamoto, et al. (1998). "Multiple genes for vacuolar-type ATPase proteolipids in *Caenorhabditis elegans*. A new gene, vha-3, has a distinct cell-specific distribution." *J Biol Chem* **273**(35): 22570-6.
- Okumura, S., T. Mizoguchi, et al. (2006). "Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton is important in osteoclast function, but calcitonin disrupts sealing zones without affecting microtubule networks." *Bone*.
- Olkokken, V. M. and H. Stenmark (1997). "Role of Rab GTPases in membrane traffic." *Int Rev Cytol* **176**: 1-85.
- Orci, L., A. Perrelet, et al. (1998). "Vesicles on strings: morphological evidence for processive transport within the Golgi stack." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2279-83.
- Ostermeyer, A. G., B. T. Beckrich, et al. (1999). "Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein." *J Biol Chem* **274**(48): 34459-66.
- Owen, D. J. and P. R. Evans (1998). "A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals." *Science* **282**(5392): 1327-32.
- Oyler, G. A., G. A. Higgins, et al. (1989). "The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations." *J Cell Biol* **109**(6 Pt 1): 3039-52.
- Padilla-Lopez, S. and D. A. Pearce (2006). "Saccharomyces cerevisiae lacking Btn1p modulate vacuolar ATPase activity to regulate pH imbalance in the vacuole." *J Biol Chem* **281**(15): 10273-80.
- Palade, G. (1975). "Intracellular aspects of the process of protein synthesis." *Science* **189**(4200): 347-58.
- Paladino, S., D. Sarnataro, et al. (2004). "Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins." *J Cell Biol* **167**(4): 699-709.
- Palay, S. L. and G. E. Palade (1955). "The fine structure of neurons." *J Biophys Biochem Cytol* **1**(1): 69-88.
- Pan, B. T., K. Teng, et al. (1985). "Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes." *J Cell Biol* **101**(3): 942-8.
- Panakova, D., H. Sprong, et al. (2005). "Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling." *Nature* **435**(7038): 58-65.
- Papini, E., M. de Bernard, et al. (1993). "Cell vacuolization induced by Helicobacter pylori: inhibition by baflomycins A1, B1, C1 and D." *FEMS Microbiol Lett* **113**(2): 155-9.
- Parada, L. F., C. J. Tabin, et al. (1982). "Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene." *Nature* **297**(5866): 474-8.
- Park, M., E. C. Penick, et al. (2004). "Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP." *Science* **305**(5692): 1972-5.
- Parlati, F., J. A. McNew, et al. (2000). "Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion." *Nature* **407**(6801): 194-8.
- Parlati, F., O. Varlamov, et al. (2002). "Distinct SNARE complexes mediating membrane fusion in Golgi transport based on combinatorial specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(8): 5424-9.
- Parra, K. J. and P. M. Kane (1998). "Reversible association between the V1 and V0 domains of yeast vacuolar H⁺-ATPase is an unconventional glucose-induced effect." *Mol Cell Biol* **18**(12): 7064-74.
- Parton, R. G., C. D. Ockleford, et al. (1987). "A study of the mechanism of internalisation of tetanus toxin by primary mouse spinal cord cultures." *J Neurochem* **49**(4): 1057-68.
- Parton, R. G., K. Simons, et al. (1992). "Axonal and dendritic endocytic pathways in cultured neurons." *J Cell Biol* **119**(1): 123-37.
- Pastor-Soler, N., V. Beaulieu, et al. (2003). "Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling." *J Biol Chem* **278**(49): 49523-9.
- Pastural, E., F. Ersoy, et al. (2000). "Two genes are responsible for Griscelli syndrome at the same 15q21 locus." *Genomics* **63**(3): 299-306.
- Paumet, F., J. Le Mao, et al. (2000). "Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment." *J Immunol* **164**(11): 5850-7.
- Paumet, F., V. Rahimian, et al. (2004). "The specificity of SNARE-dependent fusion is encoded in the SNARE motif." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10): 3376-80.
- Paunescu, T. G., N. Da Silva, et al. (2004). "Expression of the 56-kDa B2 subunit isoform of the vacuolar H(+)-ATPase in proton-secreting cells of the kidney and epididymis." *Am J Physiol Cell Physiol* **287**(1): C149-62.
- Peck, J. W., E. T. Bowden, et al. (2004). "Structure and function of human Vps20 and Snf7 proteins." *Biochem J* **377**(Pt 3): 693-700.
- Peden, A. A., G. Y. Park, et al. (2001). "The Di-leucine motif of vesicle-associated membrane protein 4 is required for its localization and AP-1 binding." *J Biol Chem* **276**(52): 49183-7.

- Pedersen, P. L. (2002). "Transport ATPases in biological systems and relationship to human disease: a brief overview." *J Bioenerg Biomembr* **34**(5): 327-32.
- Pelchen-Matthews, A., G. Raposo, et al. (2004). "Endosomes, exosomes and Trojan viruses." *Trends Microbiol* **12**(7): 310-6.
- Pelham, H. R. (2004). "Membrane traffic: GGA sort ubiquitin." *Curr Biol* **14**(9): R357-9.
- Pelkmans, L., D. Puntener, et al. (2002). "Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae." *Science* **296**(5567): 535-9.
- Pellis-van Berkel, W., M. H. Verheijen, et al. (2005). "Requirement of the *Caenorhabditis elegans* RapGEF pxf-1 and rap-1 for epithelial integrity." *Mol Biol Cell* **16**(1): 106-16.
- Peng, R., R. Grabowski, et al. (1999). "Specific interaction of the yeast cis-Golgi syntaxin Sed5p and the coat protein complex II component Sec24p of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3751-6.
- Pennuto, M., D. Bonanomi, et al. (2003). "Synaptophysin I controls the targeting of VAMP2/synaptobrevin II to synaptic vesicles." *Mol Biol Cell* **14**(12): 4909-19.
- Peranen, J., P. Auvinen, et al. (1996). "Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts." *J Cell Biol* **135**(1): 153-67.
- Perens, E. A. and S. Shaham (2005). "*C. elegans* daf-6 encodes a patched-related protein required for lumen formation." *Dev Cell* **8**(6): 893-906.
- Perez-Castineira, J. R. and D. K. Apps (1990). "Vacuolar H⁺-ATPase of adrenal secretory granules. Rapid partial purification and reconstitution into proteoliposomes." *Biochem J* **271**(1): 127-31.
- Perzov, N., V. Padler-Karavani, et al. (2001). "Features of V-ATPases that distinguish them from F-ATPases." *FEBS Lett* **504**(3): 223-8.
- Perzov, N., V. Padler-Karavani, et al. (2002). "Characterization of yeast V-ATPase mutants lacking Vph1p or Stv1p and the effect on endocytosis." *J Exp Biol* **205**(Pt 9): 1209-19.
- Peter, B. J., H. M. Kent, et al. (2004). "BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure." *Science* **303**(5657): 495-9.
- Peters, C., M. J. Bayer, et al. (2001). "Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion." *Nature* **409**(6820): 581-8.
- Peters, C. and A. Mayer (1998). "Ca²⁺/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion." *Nature* **396**(6711): 575-80.
- Peters, C., A. Wolf, et al. (2004). "The cholesterol membrane anchor of the Hedgehog protein confers stable membrane association to lipid-modified proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8531-6.
- Peters, P. J., J. Borst, et al. (1991). "Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes." *J Exp Med* **173**(5): 1099-109.
- Peterson, M. R. and S. D. Emr (2001). "The class C Vps complex functions at multiple stages of the vacuolar transport pathway." *Traffic* **2**(7): 476-86.
- Petiot, A., J. Faure, et al. (2003). "PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway." *J Cell Biol* **162**(6): 971-9.
- Pevsner, J., S. C. Hsu, et al. (1994). "Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex." *Neuron* **13**(2): 353-61.
- Pfeffer, S. R. (2001). "Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function." *Trends Cell Biol* **11**(12): 487-91.
- Philippe, J. M., J. M. Dubois, et al. (2002). "Functional expression of V-ATPases in the plasma membrane of glial cells." *Glia* **37**(4): 365-73.
- Phillips, J. H. and D. K. Apps (1980). "Stoichiometry of catecholamine/proton exchange across the chromaffin-granule membrane." *Biochem J* **192**(1): 273-8.
- Phillips, M. D. and G. H. Thomas (2006). "Brush border spectrin is required for early endosome recycling in *Drosophila*." *J Cell Sci* **119**(Pt 7): 1361-70.
- Pietrement, C., G. H. Sun-Wada, et al. (2006). "Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis." *Biol Reprod* **74**(1): 185-94.
- Pike, L. J. and J. M. Miller (1998). "Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover." *J Biol Chem* **273**(35): 22298-304.
- Pisitkun, T., R. F. Shen, et al. (2004). "Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(36): 13368-73.
- Plattner, H. and R. Kissmehl (2003). "Dense-core secretory vesicle docking and exocytic membrane fusion in *Paramecium* cells." *Biochim Biophys Acta* **1641**(2-3): 183-93.
- Poea-Guyon, S., M. Amar, et al. (2006). "Alternative Splicing Controls Neuronal Expression of v-ATPase Subunit a1 and Sorting to Nerve Terminals." *J Biol Chem* **281**(25): 17164-72.
- Polishchuk, E. V., A. Di Pentima, et al. (2003). "Mechanism of constitutive export from the golgi: bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-golgi network tubular domains." *Mol Biol Cell* **14**(11): 4470-85.
- Polishchuk, R., A. Di Pentima, et al. (2004). "Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway." *Nat Cell Biol* **6**(4): 297-307.
- Polishchuk, R. S. and A. A. Mironov (2004). "Structural aspects of Golgi function." *Cell Mol Life Sci* **61**(2): 146-58.
- Polishchuk, R. S., E. V. Polishchuk, et al. (2000). "Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane." *J Cell Biol* **148**(1): 45-58.
- Poloso, N. J., A. Muntasell, et al. (2004). "MHC class II molecules traffic into lipid rafts during intracellular transport." *J Immunol* **173**(7): 4539-46.
- Poltermann, S., M. Nguyen, et al. (2005). "The putative vacuolar ATPase subunit Vma7p of *Candida albicans* is involved in vacuole acidification, hyphal development and virulence." *Microbiology* **151**(Pt 5): 1645-55.
- Porter, J. A., S. C. Ekker, et al. (1996). "Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain." *Cell* **86**(1): 21-34.
- Porter, J. A., K. E. Young, et al. (1996). "Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development." *Science* **274**(5285): 255-9.
- Powell, B., L. A. Graham, et al. (2000). "Molecular characterization of the yeast vacuolar H⁺-ATPase proton pore." *J Biol Chem* **275**(31): 23654-60.
- Predescu, S. A., D. N. Predescu, et al. (2005). "Cholesterol-dependent syntaxin-4 and SNAP-23 clustering regulates caveolar fusion with the endothelial plasma membrane." *J Biol Chem* **280**(44): 37130-8.
- Prekeris, R., B. Yang, et al. (1999). "Differential roles of syntaxin 7 and syntaxin 8 in endosomal trafficking." *Mol Biol Cell* **10**(11): 3891-908.

- Preuss, D., J. Mulholland, et al. (1992). "Characterization of the *Saccharomyces* Golgi complex through the cell cycle by immunoelectron microscopy." *Mol Biol Cell* **3**(7): 789-803.
- Puertollano, R., R. C. Aguilar, et al. (2001). "Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs." *Science* **292**(5522): 1712-6.
- Pujol, N., C. Bonnerot, et al. (2001). "The *Caenorhabditis elegans unc-32* gene encodes alternative forms of a vacuolar ATPase a subunit." *J Biol Chem* **276**(15): 11913-21.
- Puthenveedu, M. A. and A. D. Linstedt (2001). "Evidence that Golgi structure depends on a p115 activity that is independent of the vesicle tether components giantin and GM130." *J Cell Biol* **155**(2): 227-38.
- Quenneville, N. R., T. Y. Chao, et al. (2006). "Domains within the GARP subunit Vps54 confer separate functions in complex assembly and early endosome recognition." *Mol Biol Cell* **17**(4): 1859-70.
- Quetglas, S., C. Iborra, et al. (2002). "Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis." *Embo J* **21**(15): 3970-9.
- Radax, C., O. Sigurdsson, et al. (1998). "F-and V-ATPases in the genus *Thermus* and related species." *Syst Appl Microbiol* **21**(1): 12-22.
- Raggers, R. J., T. Pomorski, et al. (2000). "Lipid traffic: the ABC of transbilayer movement." *Traffic* **1**(3): 226-34.
- Rahner, C., B. Stieger, et al. (2000). "Apical endocytosis in rat hepatocytes In situ involves clathrin, traverses a subapical compartment, and leads to lysosomes." *Gastroenterology* **119**(6): 1692-707.
- Raiborg, C., K. G. Baché, et al. (2002). "Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes." *Nat Cell Biol* **4**(5): 394-8.
- Raiborg, C., K. G. Baché, et al. (2001). "Hrs recruits clathrin to early endosomes." *Embo J* **20**(17): 5008-21.
- Raiborg, C., B. Bremnes, et al. (2001). "FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes." *J Cell Sci* **114**(Pt 12): 2255-63.
- Raiborg, C., T. E. Rusten, et al. (2003). "Protein sorting into multivesicular endosomes." *Curr Opin Cell Biol* **15**(4): 446-55.
- Rajapurohitam, V., N. Chalhoub, et al. (2001). "The mouse osteopetrosis grey-lethal mutation induces a defect in osteoclast maturation/function." *Bone* **28**(5): 513-23.
- Ramos, C. and J. Teissie (2000). "Electrofusion: a biophysical modification of cell membrane and a mechanism in exocytosis." *Biochimie* **82**(5): 511-8.
- Ramsay, L. M. and G. M. Gadd (1997). "Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification." *FEMS Microbiol Lett* **152**(2): 293-8.
- Rapoport, J., Y. C. Chen, et al. (1998). "Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site." *Embo J* **17**(8): 2148-55.
- Raposo, G., H. W. Nijman, et al. (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." *J Exp Med* **183**(3): 1161-72.
- Ratajczak, R. (2000). "Structure, function and regulation of the plant vacuolar H(+)-translocating ATPase." *Biochim Biophys Acta* **1465**(1-2): 17-36.
- Raymond, C. K., I. Howald-Stevenson, et al. (1992). "Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants." *Mol Biol Cell* **3**(12): 1389-402.
- Razani, B., J. A. Engelmann, et al. (2001). "Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities." *J Biol Chem* **276**(41): 38121-38.
- Reddy, A., E. V. Caler, et al. (2001). "Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes." *Cell* **106**(2): 157-69.
- Reggiori, F. and H. R. Pelham (2002). "A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies." *Nat Cell Biol* **4**(2): 117-23.
- Reilly, B. A., B. A. Kraynack, et al. (2001). "Golgi-to-endoplasmic reticulum (ER) retrograde traffic in yeast requires Dsl1p, a component of the ER target site that interacts with a COPI coat subunit." *Mol Biol Cell* **12**(12): 3783-96.
- Rein, U., U. Andag, et al. (2002). "ARF-GAP-mediated interaction between the ER-Golgi v-SNAREs and the COPI coat." *J Cell Biol* **157**(3): 395-404.
- Ren, G., P. Vajjhala, et al. (2006). "The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy." *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(1): 37-120.
- Rhainds, D. and L. Brissette (1999). "Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholestryl ester selective uptake." *Int J Biochem Cell Biol* **31**(9): 915-31.
- Richardson, C. J., S. Jones, et al. (1998). "GTP hydrolysis is not important for Ypt1 GTPase function in vesicular transport." *Mol Cell Biol* **18**(2): 827-38.
- Richmond, J. E. and K. S. Broadie (2002). "The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans*." *Curr Opin Neurobiol* **12**(5): 499-507.
- Riederer, M. A., T. Soldati, et al. (1994). "Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network." *J Cell Biol* **125**(3): 573-82.
- Roberts, B., C. Clucas, et al. (2003). "Loss of SEC-23 in *Caenorhabditis elegans* causes defects in oogenesis, morphogenesis, and extracellular matrix secretion." *Mol Biol Cell* **14**(11): 4414-26.
- Robinson, M. S. and J. S. Bonifacino (2001). "Adaptor-related proteins." *Curr Opin Cell Biol* **13**(4): 444-53.
- Rodriguez-Boulan, E. and A. Musch (2005). "Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms." *Biochim Biophys Acta* **1744**(3): 455-64.
- Rofstad, E. K., B. Mathiesen, et al. (2006). "Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice." *Cancer Res* **66**(13): 6699-707.
- Roggo, L., V. Bernard, et al. (2002). "Membrane transport in *Caenorhabditis elegans*: an essential role for VPS34 at the nuclear membrane." *Embo J* **21**(7): 1673-83.
- Rojas, J. D., S. R. Sennoune, et al. (2006). "Vacuolar Type H+-ATPases at the Plasma Membrane Regulate pH and Cell Migration in Microvascular Endothelial Cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
- Rolls, M. M., D. H. Hall, et al. (2002). "Targeting of rough endoplasmic reticulum membrane proteins and ribosomes in invertebrate neurons." *Mol Biol Cell* **13**(5): 1778-91.
- Rooney, S. A. (2001). "Regulation of surfactant secretion." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **129**(1): 233-43.
- Rossanese, O. W., J. Soderholm, et al. (1999). "Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* **145**(1): 69-81.
- Roszman, K. L., C. J. Der, et al. (2005). "GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2): 167-80.
- Rostaing, P., R. M. Weimer, et al. (2004). "Preservation of immunoreactivity and fine structure of adult *C. elegans* tissues using high-pressure freezing." *J Histochem Cytochem* **52**(1): 1-12.

- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." *Cell* **68**(4): 673-82.
- Rothman, J. E. (1994). "Mechanisms of intracellular protein transport." *Nature* **372**(6501): 55-63.
- Roti, E. C., C. D. Myers, et al. (2002). "Interaction with GM130 during HERG ion channel trafficking. Disruption by type 2 congenital long QT syndrome mutations. Human Ether-a-go-go-Related Gene." *J Biol Chem* **277**(49): 47779-85.
- Roudier, N., C. Lefebvre, et al. (2005). "CeVPS-27 is an Endosomal Protein Required for the Molting and the Endocytic Trafficking of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 in *Caenorhabditis elegans*." *Traffic* **6**(8): 695-705.
- Roush, D. L., C. J. Gottardi, et al. (1998). "Tyrosine-based membrane protein sorting signals are differentially interpreted by polarized Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells." *J Biol Chem* **273**(41): 26862-9.
- Rousset, M. (1986). "The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation." *Biochimie* **68**(9): 1035-40.
- Roy, S., S. Plowman, et al. (2005). "Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling." *Mol Cell Biol* **25**(15): 6722-33.
- Roy, S. W. and W. Gilbert (2005). "The pattern of intron loss." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3): 713-8.
- Roy, S. W. and W. Gilbert (2005). "Resolution of a deep animal divergence by the pattern of intron conservation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(12): 4403-8.
- Ruaud, A. F. and J. L. Bessereau (2006). "Activation of nicotinic receptors uncouples a developmental timer from the molting timer in *C. elegans*." *Development* **133**(11): 2211-22.
- Ryan, R. M., R. E. Morris, et al. (1989). "Binding and uptake of pulmonary surfactant protein (SP-A) by pulmonary type II epithelial cells." *J Histochem Cytochem* **37**(4): 429-40.
- Sabharanjak, S., P. Sharma, et al. (2002). "GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway." *Dev Cell* **2**(4): 411-23.
- Sacher, M., J. Barrowman, et al. (2001). "TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport." *Mol Cell* **7**(2): 433-42.
- Sacher, M., Y. Jiang, et al. (1998). "TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion." *Embo J* **17**(9): 2494-503.
- Sachse, M., S. Urbe, et al. (2002). "Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes." *Mol Biol Cell* **13**(4): 1313-28.
- Sahara, T., K. Itoh, et al. (2003). "Specific biological functions of vacuolar-type H(+)-ATPase and lysosomal cysteine proteinase, cathepsin K, in osteoclasts." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **270**(2): 152-61.
- Saifee, O., L. Wei, et al. (1998). "The *Caenorhabditis elegans* unc-64 locus encodes a syntaxin that interacts genetically with synaptobrevin." *Mol Biol Cell* **9**(6): 1235-52.
- Saint-Pol, A., B. Yelamos, et al. (2004). "Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes." *Dev Cell* **6**(4): 525-38.
- Sakai, H., J. Kawasaki, et al. (2006). "pH dependence and inhibition by extracellular calcium of proton currents via plasmalemmal vacuolar-type H+-ATPase in murine osteoclasts." *J Physiol*.
- Salminen, A. and P. J. Novick (1987). "A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion." *Cell* **49**(4): 527-38.
- Sambade, M., M. Alba, et al. (2005). "A genomic screen for yeast vacuolar membrane ATPase mutants." *Genetics* **170**(4): 1539-51.
- Sambade, M. and P. M. Kane (2004). "The yeast vacuolar proton-translocating ATPase contains a subunit homologous to the *Manduca sexta* and bovine e subunits that is essential for function." *J Biol Chem* **279**(17): 17361-5.
- Sapio, M. R., M. A. Hilliard, et al. (2005). "The Zona Pellucida domain containing proteins, CUT-1, CUT-3 and CUT-5, play essential roles in the development of the larval aliae in *Caenorhabditis elegans*." *Dev Biol* **282**(1): 231-45.
- Sapperstein, S. K., D. M. Walter, et al. (1995). "p115 is a general vesicular transport factor related to the yeast endoplasmic reticulum to Golgi transport factor Uso1p." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(2): 522-6.
- Saraste, J. and E. Kuismänen (1984). "Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface." *Cell* **38**(2): 535-49.
- Sarnataro, D., C. Grimaldi, et al. (2005). "Plasma membrane and lysosomal localization of CB1 cannabinoid receptor are dependent on lipid rafts and regulated by anandamide in human breast cancer cells." *FEBS Lett* **579**(28): 6343-9.
- Sato, K., S. Shikano, et al. (2006). "Selective expression of vacuolar H+-ATPase subunit d2 by particular subsets of dendritic cells among leukocytes." *Mol Immunol* **43**(9): 1443-53.
- Satoh, A., J. Malsam, et al. (2005). "Tethering assays for COPI vesicles mediated by golgins." *Methods Enzymol* **404**: 125-34.
- Satoh, A., Y. Wang, et al. (2003). "Golgin-84 is a rab1 binding partner involved in Golgi structure." *Traffic* **4**(3): 153-61.
- Savina, A., M. Furlan, et al. (2003). "Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells." *J Biol Chem* **278**(22): 20083-90.
- Saxena, S., C. L. Howe, et al. (2005). "Differential endocytic sorting of p75NTR and TrkA in response to NGF: a role for late endosomes in TrkA trafficking." *Mol Cell Neurosci* **28**(3): 571-87.
- Sbrissa, D., O. C. Ikonomov, et al. (2002). "Phosphatidylinositol 3-phosphate-interacting domains in PIKfyve. Binding specificity and role in PIKfyve. Endomembrane localization." *J Biol Chem* **277**(8): 6073-9.
- Scepekk, S., J. R. Coorssen, et al. (1998). "Fusion pore expansion in horse eosinophils is modulated by Ca²⁺ and protein kinase C via distinct mechanisms." *Embo J* **17**(15): 4340-5.
- Scheiffele, P., J. Peranen, et al. (1995). "N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells." *Nature* **378**(6552): 96-8.
- Scheiffele, P., M. G. Roth, et al. (1997). "Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain." *Embo J* **16**(18): 5501-8.
- Scheiffele, P., P. Verkade, et al. (1998). "Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells." *J Cell Biol* **140**(4): 795-806.
- Schekman, R. and L. Orci (1996). "Coat proteins and vesicle budding." *Science* **271**(5255): 1526-33.
- Schluter, O. M., E. Schnell, et al. (1999). "Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release." *J Neurosci* **19**(14): 5834-46.
- Schneider, S. W. (2001). "Kiss and run mechanism in exocytosis." *J Membr Biol* **181**(2): 67-76.
- Schoonderwoert, V. T., E. J. Jansen, et al. (2002). "The fate of newly synthesized V-ATPase accessory subunit Ac45 in the secretory pathway." *Eur J Biochem* **269**(7): 1844-53.
- Schoonderwoert, V. T. and G. J. Martens (2002). "Structural gene organization and evolutionary aspects of the V-ATPase accessory subunit Ac45." *Biophys Acta* **1574**(3): 245-54.
- Schoonderwoert, V. T. and G. J. Martens (2002). "Targeted disruption of the mouse gene encoding the V-ATPase accessory subunit Ac45." *Mol Membr Biol* **19**(1): 67-71.

- Schrag, J. D., D. O. Procopio, et al. (2003). "Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway." *Trends Biochem Sci* **28**(1): 49-57.
- Schroeder, R., E. London, et al. (1994). "Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25): 12130-4.
- Schubert, D. and F. G. Klier (1977). "Storage and release of acetylcholine by a clonal cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(11): 5184-8.
- Schuck, S. and K. Simons (2004). "Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane." *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 5955-64.
- Schuldiner, S., A. Shirvan, et al. (1995). "Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans." *Physiol Rev* **75**(2): 369-92.
- Schweitzer, E. S. (1993). "Regulated and constitutive secretion of distinct molecular forms of acetylcholinesterase from PC12 cells." *J Cell Sci* **106** (Pt 3): 731-40.
- Schweizer, A., M. Ericsson, et al. (1993). "Characterization of a novel 63 kDa membrane protein. Implications for the organization of the ER-to-Golgi pathway." *J Cell Sci* **104** (Pt 3): 671-83.
- Seabra, M. C., E. H. Mules, et al. (2002). "Rab GTPases, intracellular traffic and disease." *Trends Mol Med* **8**(1): 23-30.
- Seabra, M. C. and C. Wasmeier (2004). "Controlling the location and activation of Rab GTPases." *Curr Opin Cell Biol* **16**(4): 451-7.
- Sebastiano, M., F. Lassandro, et al. (1991). "cut-1 a *Caenorhabditis elegans* gene coding for a dauer-specific noncollagenous component of the cuticle." *Dev Biol* **146**(2): 519-30.
- Seddiki, T., S. Delpal, et al. (1994). "Two monoclonal antibodies against prolactin-receptor are internalized in epithelial mammary cells without mimetic prolactin effect on casein secretion." *Biol Cell* **81**(3): 227-35.
- Segev, N., J. Mulholland, et al. (1988). "The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery." *Cell* **52**(6): 915-24.
- Selleck, S. B. (2001). "Genetic dissection of proteoglycan function in *Drosophila* and *C. elegans*." *Semin Cell Dev Biol* **12**(2): 127-34.
- Sennoune, S. R., K. Bakunts, et al. (2004). "Vacuolar H+-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity." *Am J Physiol Cell Physiol* **286**(6): C1443-52.
- Sennoune, S. R., D. Luo, et al. (2004). "Plasmalemmal vacuolar-type H+-ATPase in cancer biology." *Cell Biochem Biophys* **40**(2): 185-206.
- Seol, J. H., A. Shevchenko, et al. (2001). "Skp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly." *Nat Cell Biol* **3**(4): 384-91.
- Shao, E. and M. Forgac (2004). "Involvement of the nonhomologous region of subunit A of the yeast V-ATPase in coupling and in vivo dissociation." *J Biol Chem* **279**(47): 48663-70.
- Shao, E., T. Nishi, et al. (2003). "Mutational analysis of the non-homologous region of subunit A of the yeast V-ATPase." *J Biol Chem* **278**(15): 12985-91.
- Sharma, P., R. Varma, et al. (2004). "Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes." *Cell* **116**(4): 577-89.
- Sheff, D. R., R. Kroschewski, et al. (2002). "Actin dependence of polarized receptor recycling in Madin-Darby canine kidney cell endosomes." *Mol Biol Cell* **13**(1): 262-75.
- Shemer, G., M. Suissa, et al. (2004). "EFF-1 is sufficient to initiate and execute tissue-specific cell fusion in *C. elegans*." *Curr Biol* **14**(17): 1587-91.
- Shen, R., T. Inoue, et al. (2005). "Synthesis of photoactivatable acyclic analogues of the lobatamides." *J Org Chem* **70**(9): 3686-92.
- Shestakova, A., S. Zolov, et al. (2006). "COG complex-mediated recycling of Golgi glycosyltransferases is essential for normal protein glycosylation." *Traffic* **7**(2): 191-204.
- Shibui, H., T. Hamamoto, et al. (1997). "The stabilizing residues and the functional domains in the hyperthermophilic V-ATPase of *Desulfurococcus*." *Biochem Biophys Res Commun* **234**(2): 341-5.
- Shih, T. Y., D. R. Williams, et al. (1978). "Comparison of the genomic organization of Kirsten and Harvey sarcoma viruses." *J Virol* **27**(1): 45-55.
- Shimokawa, N., I. Kumaki, et al. (2005). "Extracellular acidification enhances DNA binding activity of MafG-FosB heterodimer." *J Cell Physiol* **205**(1): 77-85.
- Shin, D. M., X. S. Zhao, et al. (2000). "The mammalian Sec6/8 complex interacts with Ca(2+) signaling complexes and regulates their activity." *J Cell Biol* **150**(5): 1101-12.
- Short, B., C. Preisinger, et al. (2001). "A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic." *J Cell Biol* **155**(6): 877-83.
- Shorter, J., M. B. Beard, et al. (2002). "Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115." *J Cell Biol* **157**(1): 45-62.
- Shvartsman, D. E., M. Kotler, et al. (2003). "Differently anchored influenza hemagglutinin mutants display distinct interaction dynamics with mutual rafts." *J Cell Biol* **163**(4): 879-88.
- Simmen, T., S. Honing, et al. (2002). "AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells." *Nat Cell Biol* **4**(2): 154-9.
- Simmons, A. D., M. M. Musy, et al. (1999). "A direct interaction between EXT proteins and glycosyltransferases is defective in hereditary multiple exostoses." *Hum Mol Genet* **8**(12): 2155-64.
- Simons, K. (1987). "Membrane traffic in an epithelial cell line derived from the dog kidney." *Kidney Int Suppl* **23**: S201-10.
- Simonsen, A., R. Lippe, et al. (1998). "EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion." *Nature* **394**(6692): 494-8.
- Siniossoglou, S. and H. R. Pelham (2001). "An effector of Ypt6p binds the SNARE Tlg1p and mediates selective fusion of vesicles with late Golgi membranes." *Embo J* **20**(21): 5991-8.
- Skinner, M. A. and A. G. Wildeman (1999). "beta(1) integrin binds the 16-kDa subunit of vacuolar H(+)-ATPase at a site important for human papillomavirus E5 and platelet-derived growth factor signaling." *J Biol Chem* **274**(33): 23119-27.
- Skretting, G., M. L. Torgersen, et al. (1999). "Endocytic mechanisms responsible for uptake of GPI-linked diphtheria toxin receptor." *J Cell Sci* **112** (Pt 22): 3899-909.
- Smardon, A. M., M. Tarsio, et al. (2002). "The RAVE complex is essential for stable assembly of the yeast V-ATPase." *J Biol Chem* **277**(16): 13831-9.

- Smith, A. N., F. Jouret, et al. (2005). "Vacuolar H⁺-ATPase d2 subunit: molecular characterization, developmental regulation, and localization to specialized proton pumps in kidney and bone." *J Am Soc Nephrol* **16**(5): 1245-56.
- Smith, A. N., J. Skaug, et al. (2000). "Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing." *Nat Genet* **26**(1): 71-5.
- Sobacchi, C., A. Frattini, et al. (2001). "The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis." *Hum Mol Genet* **10**(17): 1767-73.
- Sohda, M., Y. Misumi, et al. (2001). "Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin." *J Biol Chem* **276**(48): 45298-306.
- Sokac, A. M. and W. M. Bement (2006). "Kiss-and-coat and compartment mixing: coupling exocytosis to signal generation and local actin assembly." *Mol Biol Cell* **17**(4): 1495-502.
- Sokac, A. M., C. Co, et al. (2003). "Cdc42-dependent actin polymerization during compensatory endocytosis in Xenopus eggs." *Nat Cell Biol* **5**(8): 727-32.
- Sollner, T., M. K. Bennett, et al. (1993). "A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion." *Cell* **75**(3): 409-18.
- Sollner, T., S. W. Whiteheart, et al. (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." *Nature* **362**(6418): 318-24.
- Sollner, T. H. (2003). "Regulated exocytosis and SNARE function (Review)." *Mol Membr Biol* **20**(3): 209-20.
- Somers, W. G. and W. Chia (2005). "Recycling polarity." *Dev Cell* **9**(3): 312-3.
- Somsel Rodman, J. and A. Wandinger-Ness (2000). "Rab GTPases coordinate endocytosis." *J Cell Sci* **113 Pt 2**: 183-92.
- Sonnicksen, B., M. Lowe, et al. (1998). "A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes." *J Cell Biol* **140**(5): 1013-21.
- Sorensen, J. B., G. Nagy, et al. (2003). "Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23." *Cell* **114**(1): 75-86.
- Sotelo, J. R. and K. R. Porter (1959). "An electron microscope study of the rat ovum." *J Biophys Biochem Cytol* **5**(2): 327-42.
- Sotgia, F., B. Razani, et al. (2002). "Intracellular retention of glycosylphosphatidyl inositol-linked proteins in caveolin-deficient cells." *Mol Cell Biol* **22**(11): 3905-26.
- Soulet, F., D. Yarar, et al. (2005). "SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis." *Mol Biol Cell* **16**(4): 2058-67.
- Soza, A., A. Norambuena, et al. (2004). "Sorting competition with membrane-permeable peptides in intact epithelial cells revealed discrimination of transmembrane proteins not only at the trans-Golgi network but also at pre-Golgi stages." *J Biol Chem* **279**(17): 17376-83.
- Sprenger, R. R., R. D. Fontijn, et al. (2006). "Spatial segregation of transport and signalling functions between human endothelial caveolae and lipid raft proteomes." *Biochem J*.
- Staal, R. G., E. V. Mosharov, et al. (2004). "Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore." *Nat Neurosci* **7**(4): 341-6.
- Stagg, S. M., C. Gurkan, et al. (2006). "Structure of the Sec13/31 COPII coat cage." *Nature* **439**(7073): 234-8.
- Stan, R. V. (2005). "Structure of caveolae." *Biochim Biophys Acta*.
- Staunton, J., B. Ganetzky, et al. (2001). "Rabphilin potentiates soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor function independently of rab3." *J Neurosci* **21**(23): 9255-64.
- Stearns, T., M. C. Willingham, et al. (1990). "ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(3): 1238-42.
- Stehberger, P. A., N. Schulz, et al. (2003). "Localization and regulation of the ATP6V0A4 (a4) vacuolar H⁺-ATPase subunit defective in an inherited form of distal renal tubular acidosis." *J Am Soc Nephrol* **14**(12): 3027-38.
- Steinert, K., P. G. Kroth-Pancic, et al. (1995). "Nucleotide sequence of the ATPase A- and B-subunits of the halophilic archaeabacterium Haloferax volcanii and characterization of the enzyme." *Biochim Biophys Acta* **1249**(2): 137-44.
- Stenmark, H. and V. M. Olkkonen (2001). "The Rab GTPase family." *Genome Biol* **2**(5): REVIEWS3007.
- Stenmark, H., G. Vitale, et al. (1995). "Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion." *Cell* **83**(3): 423-32.
- Stevens, C. F. and J. H. Williams (2000). ""Kiss and run" exocytosis at hippocampal synapses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12828-33.
- Stevens, T. H. (1992). "The structure and function of the fungal V-ATPase." *J Exp Biol* **172**: 47-55.
- Stinchcombe, J., G. Bossi, et al. (2004). "Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes." *Science* **305**(5680): 55-9.
- Stinchcombe, J. C., L. J. Page, et al. (2000). "Secretory lysosome biogenesis in cytotoxic T lymphocytes from normal and Chediak Higashi syndrome patients." *Traffic* **1**(5): 435-44.
- Stock, C., H. K. Gronlien, et al. (2002). "Osmoregulation in Paramecium: in situ ion gradients permit water to cascade through the cytosol to the contractile vacuole." *J Cell Sci* **115**(Pt 11): 2339-48.
- Studer, D., W. Gruber, et al. (2001). "A new approach for cryofixation by high-pressure freezing." *J Microsc* **203**(Pt 3): 285-94.
- Su, Y., A. Zhou, et al. (2003). "The a-subunit of the V-type H⁺-ATPase interacts with phosphofructokinase-1 in humans." *J Biol Chem* **278**(22): 20013-8.
- Sudhof, T. C., P. De Camilli, et al. (1993). "Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins." *Cell* **75**(1): 1-4.
- Sullivan, J. M. (2006). "Synaptic vesicles caught kissing again." *Neuron* **49**(2): 167-8.
- Sulston, J. E. and H. R. Horvitz (1977). "Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*." *Dev Biol* **56**(1): 110-56.
- Sultana, H., F. Rivero, et al. (2005). "Cyclase-associated protein is essential for the functioning of the endo-lysosomal system and provides a link to the actin cytoskeleton." *Traffic* **6**(10): 930-46.
- Sumner, J. P., J. A. Dow, et al. (1995). "Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits." *J Biol Chem* **270**(10): 5649-53.
- Sun-Wada, G. H., Y. Imai-Senga, et al. (2002). "A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification." *J Biol Chem* **277**(20): 18098-105.
- Sun-Wada, G. H., Y. Wada, et al. (2003). "Lysosome and lysosome-related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-type proton ATPase." *Cell Struct Funct* **28**(5): 455-63.
- Sun-Wada, G. H., Y. Wada, et al. (2003). "Vacuolar H⁺ pumping ATPases in luminal acidic organelles and extracellular compartments: common rotational mechanism and diverse physiological roles." *J Bioenerg Biomembr* **35**(4): 347-58.
- Supek, F., L. Suprkova, et al. (1994). "A novel accessory subunit for vacuolar H(+)-ATPase from chromaffin granules." *J Biol Chem* **269**(39): 24102-6.

- Suvorova, E. S., R. Duden, et al. (2002). "The Sec34/Sec35p complex, a Ypt1p effector required for retrograde intra-Golgi trafficking, interacts with Golgi SNAREs and COPI vesicle coat proteins." *J Cell Biol* **157**(4): 631-43.
- Suzuki, M., N. Sagoh, et al. (2004). "Metalloproteases with EGF, CUB, and thrombospondin-1 domains function in molting of *Caenorhabditis elegans*." *Biol Chem* **385**(6): 565-8.
- Suzuki, N., M. Buechner, et al. (2001). "A putative GDP-GTP exchange factor is required for development of the excretory cell in *Caenorhabditis elegans*." *EMBO Rep* **2**(6): 530-5.
- Sztul, E. and V. Lupashin (2006). "Role of tethering factors in secretory membrane traffic." *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(1): C11-26.
- Takai, Y., K. Kaibuchi, et al. (1993). "Regulators of small GTPases." *Ciba Found Symp* **176**: 128-38; discussion 138-46.
- Takai, Y., T. Sasaki, et al. (2001). "Small GTP-binding proteins." *Physiol Rev* **81**(1): 153-208.
- Takeda, T., H. Yamazaki, et al. (2003). "Identification of an apical sorting determinant in the cytoplasmic tail of megalin." *Am J Physiol Cell Physiol* **284**(5): C1105-13.
- Tall, R. D., M. A. Alonso, et al. (2003). "Features of influenza HA required for apical sorting differ from those required for association with DRMs or MAL." *Traffic* **4**(12): 838-49.
- Tanaka, Y., Y. Okada, et al. (2005). "FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination." *Nature* **435**(7039): 172-7.
- Tang, B. L., F. Peter, et al. (1997). "The mammalian homolog of yeast Sec13p is enriched in the intermediate compartment and is essential for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus." *Mol Cell Biol* **17**(1): 256-66.
- Taranta, A., S. Migliaccio, et al. (2003). "Genotype-phenotype relationship in human ATP6i-dependent autosomal recessive osteopetrosis." *Am J Pathol* **162**(1): 57-68.
- Taraska, J. W. and W. Almers (2004). "Bilayers merge even when exocytosis is transient." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8780-5.
- TerBush, D. R., T. Maurice, et al. (1996). "The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* **15**(23): 6483-94.
- Thery, C., M. Boussac, et al. (2001). "Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles." *J Immunol* **166**(12): 7309-18.
- Thery, C., L. Duban, et al. (2002). "Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes." *Nat Immunol* **3**(12): 1156-62.
- Thery, C., A. Regnault, et al. (1999). "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73." *J Cell Biol* **147**(3): 599-610.
- Thery, C., L. Zitvogel, et al. (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." *Nat Rev Immunol* **2**(8): 569-79.
- Thevenod, F. (2002). "Ion channels in secretory granules of the pancreas and their role in exocytosis and release of secretory proteins." *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(3): C651-72.
- Thorn, P., K. E. Fogarty, et al. (2004). "Zymogen granule exocytosis is characterized by long fusion pore openings and preservation of vesicle lipid identity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6774-9.
- Thorn, P. and I. Parker (2005). "Two phases of zymogen granule lifetime in mouse pancreas: ghost granules linger after exocytosis of contents." *J Physiol* **563**(Pt 2): 433-42.
- Tian, H., J. Jeong, et al. (2005). "Mouse Disp1 is required in sonic hedgehog-expressing cells for paracrine activity of the cholesterol-modified ligand." *Development* **132**(1): 133-42.
- Tian, H., T. Tenzen, et al. (2004). "Dose dependency of Disp1 and genetic interaction between Disp1 and other hedgehog signaling components in the mouse." *Development* **131**(16): 4021-33.
- Tjelle, T. E., A. Brech, et al. (1996). "Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation." *J Cell Sci* **109** (Pt 12): 2905-14.
- Togashi, K., T. Kataoka, et al. (1997). "Characterization of a series of vacuolar type H(+)-ATPase inhibitors on CTL-mediated cytotoxicity." *Immunol Lett* **55**(3): 139-44.
- Tooze, J. and M. Hollinshead (1991). "Tubular early endosomal networks in AtT20 and other cells." *J Cell Biol* **115**(3): 635-53.
- Torigoe, T., H. Izumi, et al. (2002). "Enhanced expression of the human vacuolar H+-ATPase c subunit gene (ATP6L) in response to anticancer agents." *J Biol Chem* **277**(39): 36534-43.
- Touchot, N., P. Chardin, et al. (1987). "Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(23): 8210-4.
- Toyoda, H., A. Kinoshita-Toyoda, et al. (2000). "Structural analysis of glycosaminoglycans in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* and demonstration that tout-velu, a *Drosophila* gene related to EXT tumor suppressors, affects heparan sulfate in vivo." *J Biol Chem* **275**(4): 2269-75.
- Toyomura, T., Y. Murata, et al. (2003). "From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H+ -ATPase with the a3 isoform during osteoclast differentiation." *J Biol Chem* **278**(24): 22023-30.
- Toyomura, T., T. Oka, et al. (2000). "Three subunit a isoforms of mouse vacuolar H(+)-ATPase. Preferential expression of the a3 isoform during osteoclast differentiation." *J Biol Chem* **275**(12): 8760-5.
- Traub, L. M. and S. Kornfeld (1997). "The trans-Golgi network: a late secretory sorting station." *Curr Opin Cell Biol* **9**(4): 527-33.
- Treusch, S., S. Knuth, et al. (2004). "Caenorhabditis elegans functional orthologue of human protein h-mucolipin-1 is required for lysosome biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13): 4483-8.
- Trimble, W. S., D. M. Cowan, et al. (1988). "VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(12): 4538-42.
- Trucco, A., R. S. Polischuk, et al. (2004). "Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments." *Nat Cell Biol* **6**(11): 1071-81.
- Tsuboi, T. and G. A. Rutter (2003). "Multiple forms of "kiss-and-run" exocytosis revealed by evanescent wave microscopy." *Curr Biol* **13**(7): 563-7.
- Tsui, M. M. and D. K. Banfield (2000). "Yeast Golgi SNARE interactions are promiscuous." *J Cell Sci* **113** (Pt 1): 145-52.
- Tsutsumi, S., K. Denda, et al. (1991). "Molecular cloning of genes encoding major two subunits of a eubacterial V-type ATPase from *Thermus thermophilus*." *Biochim Biophys Acta* **1098**(1): 13-20.
- Turley, S. J., K. Inaba, et al. (2000). "Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells." *Science* **288**(5465): 522-7.
- Turnbull, A. P., D. Kummel, et al. (2005). "Structure of palmitoylated BET3: insights into TRAPP complex assembly and membrane localization." *Embo J* **24**(5): 875-84.
- Ungar, D., T. Oka, et al. (2006). "Retrograde transport on the COG railway." *Trends Cell Biol* **16**(2): 113-20.
- Ungermann, C., B. J. Nichols, et al. (1998). "A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion." *J Cell Biol* **140**(1): 61-9.

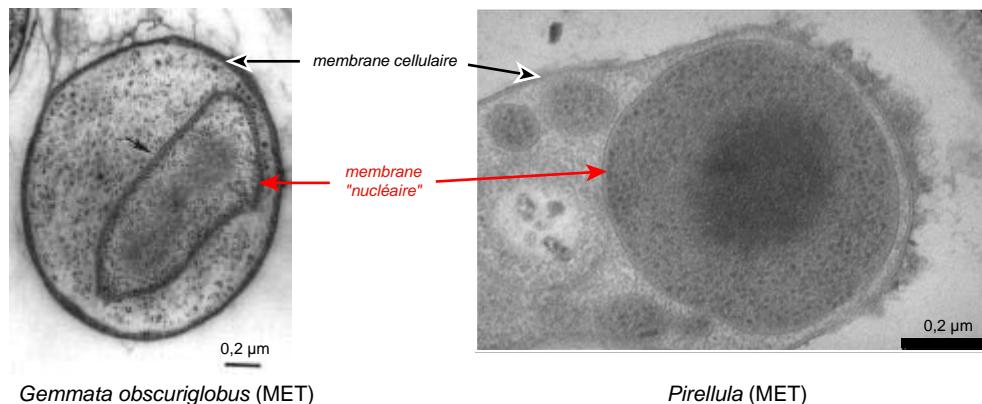
- Ungermann, C., K. Sato, et al. (1998). "Defining the functions of trans-SNARE pairs." *Nature* **396**(6711): 543-8.
- Ungermann, C., W. Wickner, et al. (1999). "Vacuole acidification is required for trans-SNARE pairing, LMA1 release, and homotypic fusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11194-9.
- Urbe, S., I. G. Mills, et al. (2000). "Endosomal localization and receptor dynamics determine tyrosine phosphorylation of hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate." *Mol Cell Biol* **20**(20): 7685-92.
- Urbe, S., M. Sachse, et al. (2003). "The UIM domain of Hrs couples receptor sorting to vesicle formation." *J Cell Sci* **116**(Pt 20): 4169-79.
- Valdez-Taubas, J. and H. Pelham (2005). "Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation." *Embo J* **24**(14): 2524-32.
- Valdez, A. C., J. P. Cabaniols, et al. (1999). "Syntaxin 11 is associated with SNAP-23 on late endosomes and the trans-Golgi network." *J Cell Sci* **112** (Pt 6): 845-54.
- Valtorta, F., J. Meldelesi, et al. (2001). "Synaptic vesicles: is kissing a matter of competence?" *Trends Cell Biol* **11**(8): 324-8.
- van Deurs, B., P. K. Holm, et al. (1993). "Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes." *Eur J Cell Biol* **61**(2): 208-24.
- van Deurs, B., P. K. Holm, et al. (1996). "Inhibition of the vacuolar H(+)-ATPase with bafilomycin reduces delivery of internalized molecules from mature multivesicular endosomes to lysosomes in HEp-2 cells." *Eur J Cell Biol* **69**(4): 343-50.
- Van, I. S. C., O. Maier, et al. (2000). "The subapical compartment and its role in intracellular trafficking and cell polarity." *J Cell Physiol* **184**(2): 151-60.
- van Meer, G. and K. Simons (1988). "Lipid polarity and sorting in epithelial cells." *J Cell Biochem* **36**(1): 51-8.
- van Niel, G. and M. Heyman (2002). "The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. II. Intestinal epithelial cell exosomes: perspectives on their structure and function." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**(2): G251-5.
- van Weeren, L., A. M. de Graaff, et al. (2004). "Rab3D and actin reveal distinct lamellar body subpopulations in alveolar epithelial type II cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**(3): 288-95.
- Vanheyningen, H. E. (1964). "Secretion of Protein by the Acinar Cells of the Rat Pancreas as Studied by Electron Microscopic Radioautography." *Anat Rec* **148**: 485-97.
- Vasilyeva, E. and M. Forgac (1996). "3'-O-(4-Benzoyl)benzoyladenosine 5'-triphosphate inhibits activity of the vacuolar (H⁺)-ATPase from bovine brain clathrin-coated vesicles by modification of a rapidly exchangeable, noncatalytic nucleotide binding site on the B subunit." *J Biol Chem* **271**(22): 12775-82.
- Verges, M., R. J. Havel, et al. (1999). "A tubular endosomal fraction from rat liver: biochemical evidence of receptor sorting by default." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(18): 10146-51.
- Vijayasaradhi, S., P. M. Doskoch, et al. (1995). "Melanocyte differentiation marker gp75, the brown locus protein, can be regulated independently of tyrosinase and pigmentation." *J Invest Dermatol* **105**(1): 113-9.
- Vitale, G., K. Alexandrov, et al. (1995). "The GDP/GTP cycle of Rab5 in the regulation of endocytotic membrane traffic." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**: 211-20.
- Vitale, G., V. Rybin, et al. (1998). "Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5." *Embo J* **17**(7): 1941-51.
- Vitavská, O., H. Merzendorfer, et al. (2005). "The V-ATPase subunit C binds to polymeric F-actin as well as to monomeric G-actin and induces cross-linking of actin filaments." *J Biol Chem* **280**(2): 1070-6.
- Vitavská, O., H. Wieczorek, et al. (2003). "A novel role for subunit C in mediating binding of the H⁺-V-ATPase to the actin cytoskeleton." *J Biol Chem* **278**(20): 18499-505.
- Volchuk, A., M. Ravazzola, et al. (2004). "Countercurrent distribution of two distinct SNARE complexes mediating transport within the Golgi stack." *Mol Biol Cell* **15**(4): 1506-18.
- Wade, N., N. J. Bryant, et al. (2001). "Syntaxin 7 complexes with mouse Vps10p tail interactor 1b, syntaxin 6, vesicle-associated membrane protein (VAMP)8, and VAMP7 in b16 melanoma cells." *J Biol Chem* **276**(23): 19820-7.
- Wahle, T., K. Prager, et al. (2005). "GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network." *Mol Cell Neurosci* **29**(3): 453-61.
- Walch-Solimena, C., J. Blasi, et al. (1995). "The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling." *J Cell Biol* **128**(4): 637-45.
- Walch-Solimena, C., R. N. Collins, et al. (1997). "Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles." *J Cell Biol* **137**(7): 1495-509.
- Wang, C. C., C. P. Ng, et al. (2004). "A role of VAMP8/endobrevin in regulated exocytosis of pancreatic acinar cells." *Dev Cell* **7**(3): 359-71.
- Wang, C. T., J. C. Lu, et al. (2003). "Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion." *Nature* **424**(6951): 943-7.
- Wang, E., P. S. Brown, et al. (2000). "Apical and basolateral endocytic pathways of MDCK cells meet in acidic common endosomes distinct from a nearly-neutral apical recycling endosome." *Traffic* **1**(6): 480-93.
- Wang, Y., T. Inoue, et al. (2004). "TM2 but not TM4 of subunit c" interacts with TM7 of subunit a of the yeast V-ATPase as defined by disulfide-mediated cross-linking." *J Biol Chem* **279**(43): 44628-38.
- Wang, Y., T. Inoue, et al. (2005). "Subunit a of the yeast V-ATPase participates in binding of bafilomycin." *J Biol Chem*.
- Wang, Y., M. Okamoto, et al. (1997). "Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion." *Nature* **388**(6642): 593-8.
- Wang, Y., S. Sugita, et al. (2000). "The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins." *J Biol Chem* **275**(26): 20033-44.
- Wasle, B. and J. M. Edwardson (2002). "The regulation of exocytosis in the pancreatic acinar cell." *Cell Signal* **14**(3): 191-7.
- Wassmer, T., M. Froissard, et al. (2005). "The vacuolar proton-ATPase plays a major role in several membrane-bounded organelles in Paramecium." *J Cell Sci* **118**(Pt 13): 2813-25.
- Wassmer, T., R. Kissmehl, et al. (2006). "Seventeen a-subunit isoforms of paramecium V-ATPase provide high specialization in localization and function." *Mol Biol Cell* **17**(2): 917-30.
- Watanabe, R. and H. Riezman (2004). "Differential ER exit in yeast and mammalian cells." *Curr Opin Cell Biol* **16**(4): 350-5.
- Waterford, S. D., T. R. Kolodecik, et al. (2005). "Vacuolar ATPase regulates zymogen activation in pancreatic acini." *J Biol Chem* **280**(7): 5430-4.
- Watson, P. and D. J. Stephens (2005). "ER-to-Golgi transport: form and formation of vesicular and tubular carriers." *Biochim Biophys Acta* **1744**(3): 304-15.
- Wedlich-Soldner, R., S. Altschuler, et al. (2003). "Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase." *Science* **299**(5610): 1231-5.

- Wei, A., A. Yuan, et al. (2002). "Efficient isolation of targeted *Caenorhabditis elegans* deletion strains using highly thermostable restriction endonucleases and PCR." *Nucleic Acids Res* **30**(20): e110.
- Weible, M. W., 2nd and I. A. Hendry (2004). "What is the importance of multivesicular bodies in retrograde axonal transport in vivo?" *J Neurobiol* **58**(2): 230-43.
- Weimbs, T., S. H. Low, et al. (2003). "SNAREs and epithelial cells." *Methods* **30**(3): 191-7.
- Weimer, R. M., E. O. Gracheva, et al. (2006). "UNC-13 and UNC-10/rim localize synaptic vesicles to specific membrane domains." *J Neurosci* **26**(31): 8040-7.
- Weimer, R. M. and E. M. Jorgensen (2003). "Controversies in synaptic vesicle exocytosis." *J Cell Sci* **116**(Pt 18): 3661-6.
- Weng, X. H., M. Huss, et al. (2003). "The V-type H(+)-ATPase in Malpighian tubules of *Aedes aegypti*: localization and activity." *J Exp Biol* **206**(Pt 13): 2211-9.
- Wessel, G. M., J. M. Brooks, et al. (2001). "The biology of cortical granules." *Int Rev Cytol* **209**: 117-206.
- Whalley, T., M. Terasaki, et al. (1995). "Direct membrane retrieval into large vesicles after exocytosis in sea urchin eggs." *J Cell Biol* **131**(5): 1183-92.
- Whitley, P., B. J. Reaves, et al. (2003). "Identification of mammalian Vps24p as an effector of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-dependent endosome compartmentalization." *J Biol Chem* **278**(40): 38786-95.
- Whyteside, G., P. J. Meek, et al. (2005). "Concanamycin and indolyl pentadieneamide inhibitors of the vacuolar H+-ATPase bind with high affinity to the purified proteolipid subunit of the membrane domain." *Biochemistry* **44**(45): 15024-31.
- Wickner, W. and A. Haas (2000). "Yeast homotypic vacuole fusion: a window on organelle trafficking mechanisms." *Annu Rev Biochem* **69**: 247-75.
- Wieczorek, H., D. Brown, et al. (1999). "Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases." *Bioessays* **21**(8): 637-48.
- Wieczorek, H., G. Grber, et al. (2000). "Structure and regulation of insect plasma membrane H(+)-V-ATPase." *J Exp Biol* **203**(Pt 1): 127-35.
- Wieczorek, H., M. Huss, et al. (2003). "The insect plasma membrane H+ V-ATPase: intra-, inter-, and supramolecular aspects." *J Bioenerg Biomembr* **35**(4): 359-66.
- Wieland, F. and C. Harter (1999). "Mechanisms of vesicle formation: insights from the COP system." *Curr Opin Cell Biol* **11**(4): 440-6.
- Wigge, P., Y. Vallis, et al. (1997). "Inhibition of receptor-mediated endocytosis by the amphiphysin SH3 domain." *Curr Biol* **7**(8): 554-60.
- Wightman, R. M. and C. L. Haynes (2004). "Synaptic vesicles really do kiss and run." *Nat Neurosci* **7**(4): 321-2.
- Wilkins, S. (2005). "Rotary molecular motors." *Adv Protein Chem* **71**: 345-82.
- Wilkins, S. and M. Forgac (2001). "Three-dimensional structure of the vacuolar ATPase proton channel by electron microscopy." *J Biol Chem* **276**(47): 44064-8.
- Wilkins, S., Z. Zhang, et al. (2005). "A structural model of the vacuolar ATPase from transmission electron microscopy." *Micron* **36**(2): 109-26.
- Wilson, J. M., J. A. Whitney, et al. (1991). "Biogenesis of the apical endosome-lysosome complex during differentiation of absorptive epithelial cells in rat ileum." *J Cell Sci* **100** (Pt 1): 133-43.
- Wilton, J. C. and G. M. Matthews (1996). "Polarised membrane traffic in hepatocytes." *Bioessays* **18**(3): 229-36.
- Wolf, Y. I., I. B. Rogozin, et al. (2004). "Coelomata and not Ecdysozoa: evidence from genome-wide phylogenetic analysis." *Genome Res* **14**(1): 29-36.
- Wolfsberger, M. G. (1992). "V-ATPase-energized epithelia and biological insect control." *J Exp Biol* **172**: 377-86.
- Wubbolts, R., R. S. Leckie, et al. (2003). "Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation." *J Biol Chem* **278**(13): 10963-72.
- Wyse, B. D., I. A. Prior, et al. (2003). "Caveolin interacts with the angiotensin II type 1 receptor during exocytic transport but not at the plasma membrane." *J Biol Chem* **278**(26): 23738-46.
- Xie, X. S., D. Padron, et al. (2004). "Salicylihalamide A inhibits the V₀ sector of the V-ATPase through a mechanism distinct from baflomycin A1." *J Biol Chem* **279**(19): 19755-63.
- Xu, T. and M. Forgac (2000). "Subunit D (Vma8p) of the yeast vacuolar H+-ATPase plays a role in coupling of proton transport and ATP hydrolysis." *J Biol Chem* **275**(29): 22075-81.
- Xu, T. and M. Forgac (2001). "Microtubules are involved in glucose-dependent dissociation of the yeast vacuolar [H+]-ATPase in vivo." *J Biol Chem* **276**(27): 24855-61.
- Xu, T., E. Vasilyeva, et al. (1999). "Subunit interactions in the clathrin-coated vesicle vacuolar (H(+))-ATPase complex." *J Biol Chem* **274**(41): 28909-15.
- Yamashiro, D. J. and F. R. Maxfield (1984). "Acidification of endocytic compartments and the intracellular pathways of ligands and receptors." *J Cell Biochem* **26**(4): 231-46.
- Yang, B., L. Gonzalez, Jr., et al. (1999). "SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity." *J Biol Chem* **274**(9): 5649-53.
- Yang, Q., G. Li, et al. (2006). "Vacuolar H+-ATPase B1 Subunit Mutations that Cause Inherited Distal Renal Tubular Acidosis Affect Proton Pump Assembly and Trafficking in Inner Medullary Collecting Duct Cells." *J Am Soc Nephrol*.
- Yang, W. and R. A. Cerione (1999). "Endocytosis: Is dynamin a 'blue collar' or 'white collar' worker?" *Curr Biol* **9**(14): R511-4.
- Yeaman, C., M. I. Ayala, et al. (2004). "Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network." *Nat Cell Biol* **6**(2): 106-12.
- Yeaman, C., A. H. Le Gall, et al. (1997). "The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells." *J Cell Biol* **139**(4): 929-40.
- Yochim, J., S. Tuck, et al. (1999). "A gp330/megalin-related protein is required in the major epidermis of *Caenorhabditis elegans* for completion of molting." *Development* **126**(3): 597-606.
- Yokoyama, K., M. Nakano, et al. (2003). "Rotation of the proteolipid ring in the V-ATPase." *J Biol Chem* **278**(27): 24255-8.
- Yoshida, Y., M. Kinuta, et al. (2004). "The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature." *Embo J* **23**(17): 3483-91.
- Yoshida, Y. and K. Takei (2005). "Stimulation of dynamin GTPase activity by amphiphysin." *Methods Enzymol* **404**: 528-37.
- Yoshinaka, K., H. Kumanogoh, et al. (2004). "Identification of V-ATPase as a major component in the raft fraction prepared from the synaptic plasma membrane and the synaptic vesicle of rat brain." *Neurosci Lett* **363**(2): 168-72.
- Young, J., T. Stauber, et al. (2005). "Regulation of microtubule-dependent recycling at the trans-Golgi network by Rab6A and Rab6A'." *Mol Biol Cell* **16**(1): 162-77.
- Zacchi, P., H. Stenmark, et al. (1998). "Rab17 regulates membrane trafficking through apical recycling endosomes in polarized epithelial cells." *J Cell Biol* **140**(5): 1039-53.

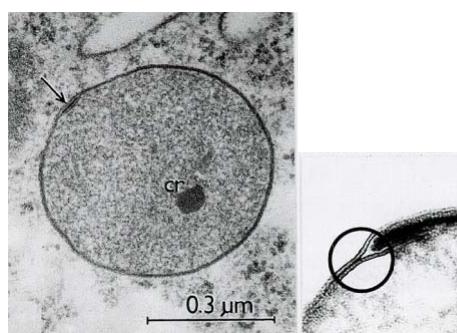
- Zaitseva, E., A. Mittal, et al. (2005). "Class II fusion protein of alphaviruses drives membrane fusion through the same pathway as class I proteins." *J Cell Biol* **169**(1): 167-77.
- Zefirov, A. L., M. M. Abdurakhmanov, et al. (2004). "Kiss-and-run quantal secretion in frog nerve-muscle synapse." *Bull Exp Biol Med* **137**(2): 107-10.
- Zegers, M. M. and D. Hoekstra (1998). "Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells." *Biochem J* **336** (Pt 2): 257-69.
- Zhan, H., K. Yokoyama, et al. (2003). "Different roles of proteolipids and 70-kDa subunits of V-ATPase in growth and death of cultured human cells." *Genes Cells* **8**(6): 501-13.
- Zhang, J., E. Vasilyeva, et al. (1995). "Inhibition and labeling of the coated vesicle V-ATPase by 2-azido-[32P]ATP." *J Biol Chem* **270**(26): 15494-500.
- Zhang, J. W., K. J. Parra, et al. (1998). "Characterization of a temperature-sensitive yeast vacuolar ATPase mutant with defects in actin distribution and bud morphology." *J Biol Chem* **273**(29): 18470-80.
- Zhang, X., E. Bi, et al. (2001). "Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion." *J Biol Chem* **276**(50): 46745-50.
- Zhang, X. M., S. Ellis, et al. (2004). "Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells." *J Biol Chem* **279**(41): 43027-34.
- Zhao, H. and H. K. Vaananen (2006). "Pharmacological sequestration of intracellular cholesterol in late endosomes disrupts ruffled border formation in osteoclasts." *J Bone Miner Res* **21**(3): 456-65.
- Zhao, L., J. B. Helms, et al. (1997). "Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatomer subunit beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4418-23.
- Zhao, L., J. B. Helms, et al. (1999). "GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatomer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23." *J Biol Chem* **274**(20): 14198-203.
- Zhu, Y., B. Doray, et al. (2001). "Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor." *Science* **292**(5522): 1716-8.
- Zimmerberg, J. (2000). "Are the curves in all the right places?" *Traffic* **1**(4): 366-8.
- Zimmerberg, J. and L. V. Chernomordik (1999). "Membrane fusion." *Adv Drug Deliv Rev* **38**(3): 197-205.
- Zimmerberg, J. and S. McLaughlin (2004). "Membrane curvature: how BAR domains bend bilayers." *Curr Biol* **14**(6): R250-2.
- Zimniak, L., P. Dittrich, et al. (1988). "The cDNA sequence of the 69-kDa subunit of the carrot vacuolar H+-ATPase. Homology to the beta-chain of F0F1-ATPases." *J Biol Chem* **263**(19): 9102-12.
- Zolov, S. N. and V. V. Lupashin (2005). "Cog3p depletion blocks vesicle-mediated Golgi retrograde trafficking in HeLa cells." *J Cell Biol* **168**(5): 747-59.
- Zugasti, O., J. Rajan, et al. (2005). "The function and expansion of the Patched- and Hedgehog-related homologs in *C. elegans*." *Genome Res* **15**(10): 1402-10.
- Zuo, J., J. Jiang, et al. (2006). "Actin Binding Activity of Subunit B of Vacuolar H(+) -ATPase Is Involved in Its Targeting to Ruffled Membranes of Osteoclasts." *J Bone Miner Res* **21**(5): 714-21.

Annexe 1. ORGANITES D'ORGANISMES NON CONVENTIONNELS.

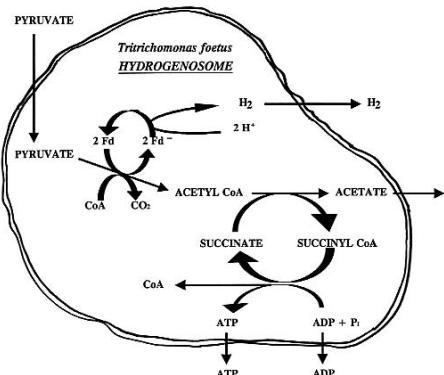
A Des procaryotes dotés d'un noyau ?



B1 Hydrogénosome (MET)



B2



LEGENDE.

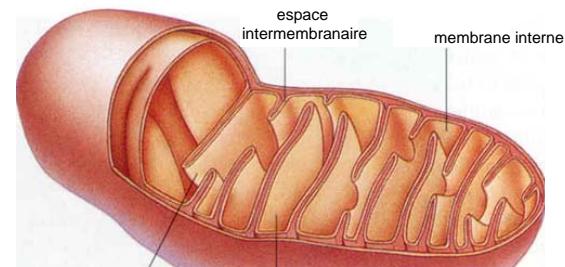
A : Certains procaryotes possèdent une simple ou une double membrane "nucléaire".

B1 : Certains eucaryotes comme les Trichomonades, certains Ciliés et Amoebolflagellés ne possèdent pas de mitochondries mais un ou quelques organites apparentés appelés hydrogénosomes, également pourvus d'une double membrane (encart).

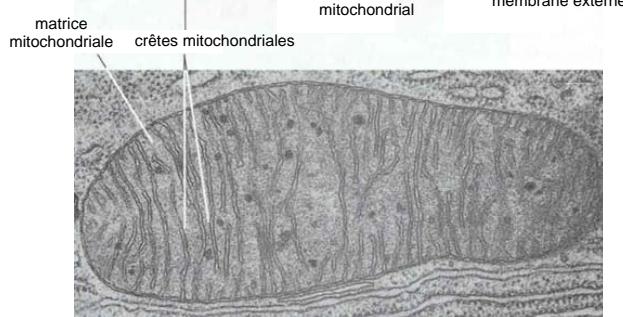
B2 : Métabolisme de l'hydrogénosome de *Trichomonas foetus*.

Annexe 2. LA MITOCHONDRIE.

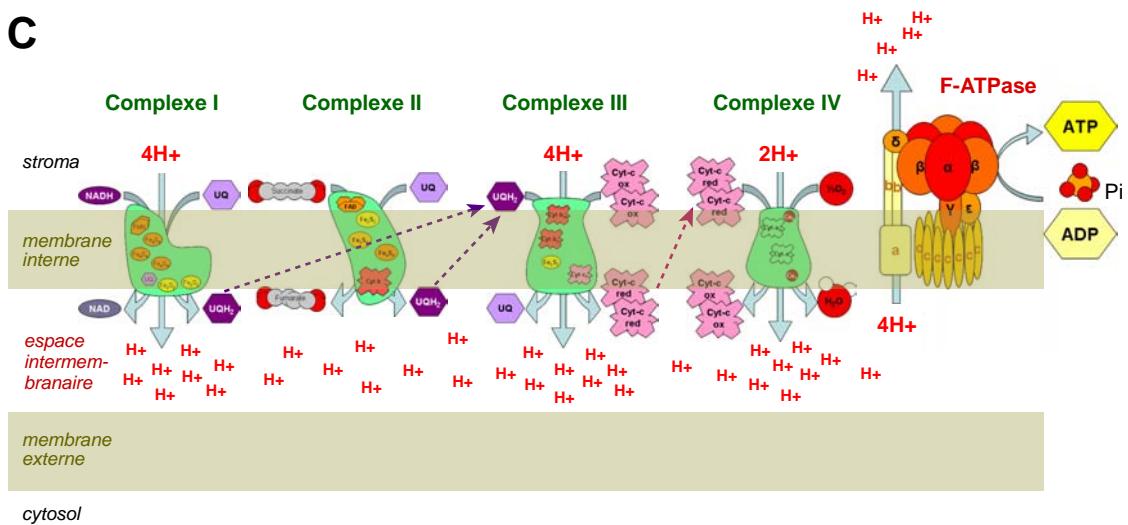
A



B



C



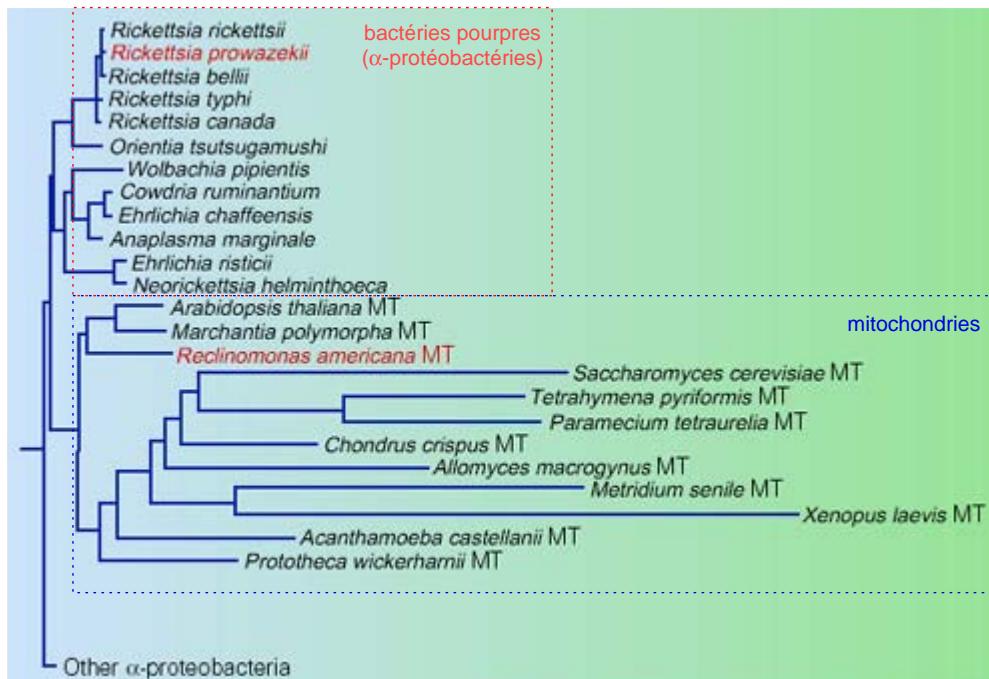
LEGENDE.

A : Schéma simplifié d'une mitochondrie. La mitochondrie possède une double membrane ménageant un espace intermembranaire utilisé pour stocker les protons accumulés par la chaîne respiratoire. L'équivalent du cytoplasme mitochondrial est appelé stroma, contient des ribosomes, l'ADN mitochondrial, etc. C'est à ce niveau que se déroule le cycle de Krebs.

B : Mitochondrie en coupe longitudinale visualisée en microscopie électronique à transmission (MET).

C : Chaîne respiratoire et production d'ATP par la mitochondrie. La chaîne respiratoire stocke des protons dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Le gradient de protons ainsi généré alimente la pompe F-ATPase qui produit alors de l'ATP à partir d'ADP + Pi. L'ATP produit est exporté dans le cytosol grâce notamment à un transporteur ADP/ATP et utilisé par le métabolisme cellulaire.

Annexe 3. PHYLOGENIE DES MITOCHONDRIES.

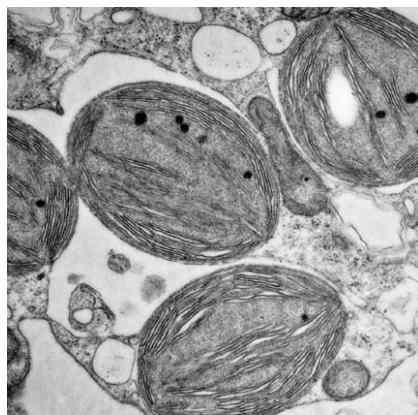


LEGENDE.

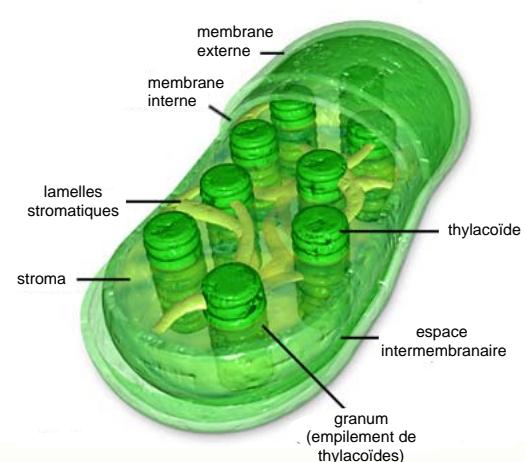
Les mitochondries (encadré bleu) sont apparentées aux bactéries pourpres (encadré rouge). *Rickettsia prowazekii* est indiquée en rouge car c'est l'analyse de son génome qui a permis de mettre à jour clairement cette parenté. Le génome mitochondrial de *Reclinomonas americana* de son côté, est le plus proche de la mitochondrie ancestrale et a révélé notamment que la mitochondrie possédait au départ sa propre ARN polymérase bactérienne, ainsi que l'essentiel des gènes requis pour assurer une survie autonome.

Annexe 4. LES PLASTES

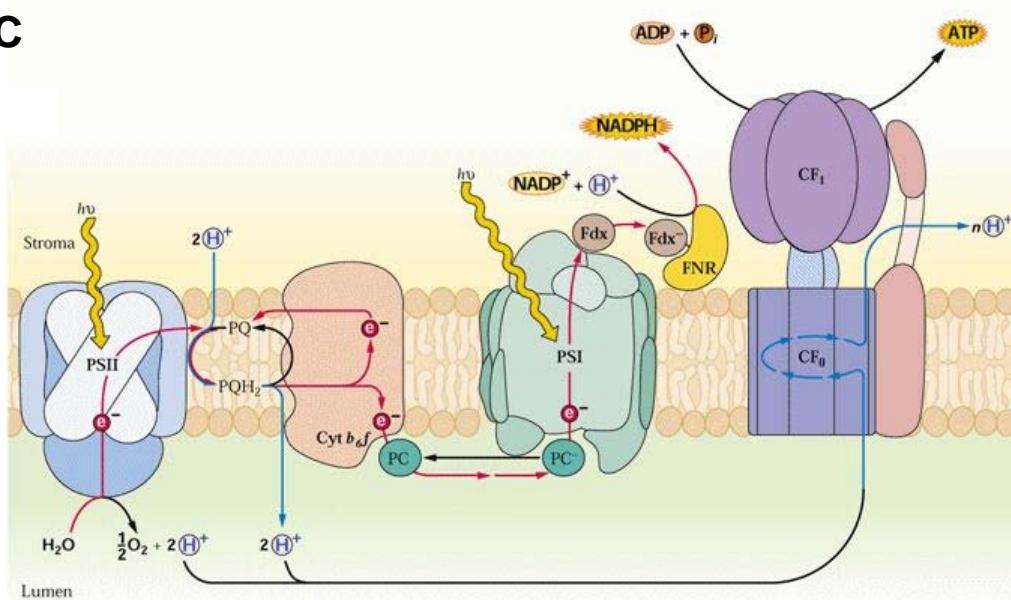
A



B



C



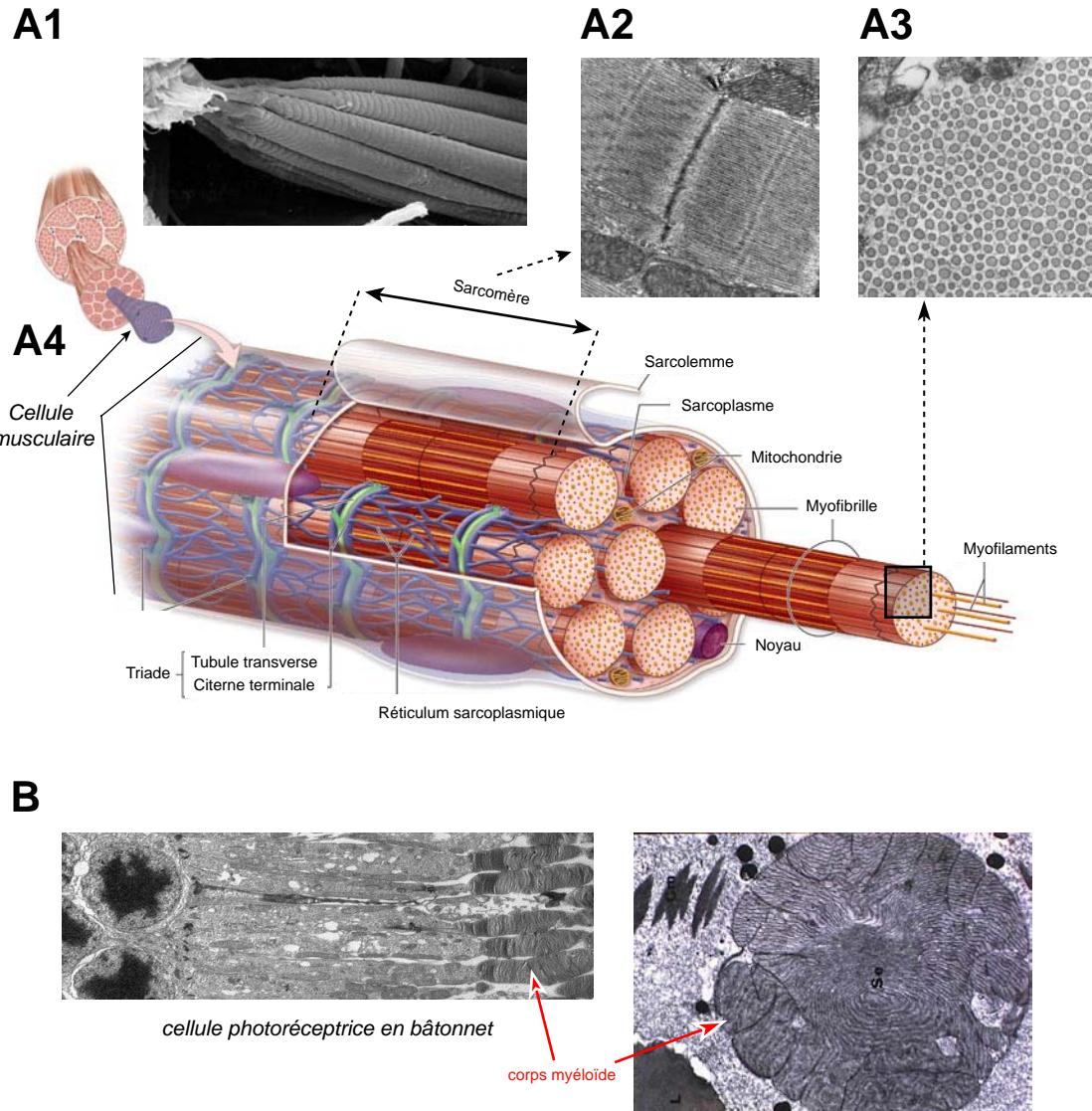
LEGENDE.

A : Chloroplastes en microscopie électronique à transmission (MET).

B : Schéma de l'organisation d'un chloroplaste.

C : Les membranes des thylacoïdes comportent de nombreux photorécepteurs dont l'activité permet l'oxydation de NADPH en NADPH_{H+}, et l'acidification de l'espace intermembranaire thylacoïdien. Le gradient de protons ainsi généré est utilisé par la F-ATPase pour synthétiser de l'ATP. NADPH_{H+} et ATP sont ensuite consommés avec du CO₂ pour synthétiser des trioses, puis des hexoses, pentoses, amidon, gycérol, acides gras, aminés, etc.

Annexe 5. DEUX CELLULES DIFFERENCIEES ET LEUR COMPARTIMENTS SPECIFIQUES.



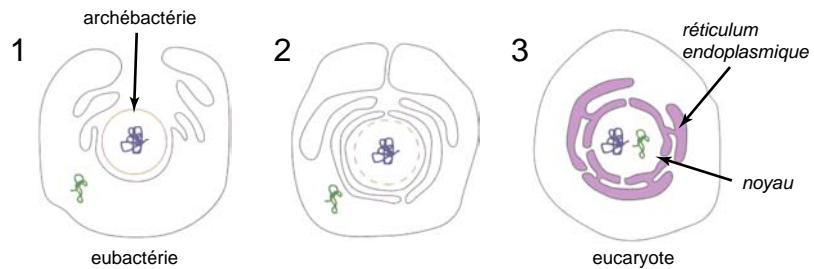
LEGENDE.

A : Cellule musculaire squelettique de vertébré. La cellule musculaire possède plusieurs spécificités au niveau de ses organites. Tout d'abord c'est un syncytium dérivé d'un myotube et contenant plusieurs noyaux. Ensuite, elle possède des fibrilles composés de sacromères (A2), unités contractiles faites de filaments d'acto-myosine. Elle possède également un réticulum particulier, dit sarcoplasmique (RS) séquestrant le calcium dont la décharge stimulate l'activité musculaire. A1, vue en microscopie électronique à balayage de fibres musculaires. A2, coupe longitudinale d'un sarcomère. A3, coupe transversale d'un sarcomère. A4, Schéma simplifié d'une cellule musculaire.

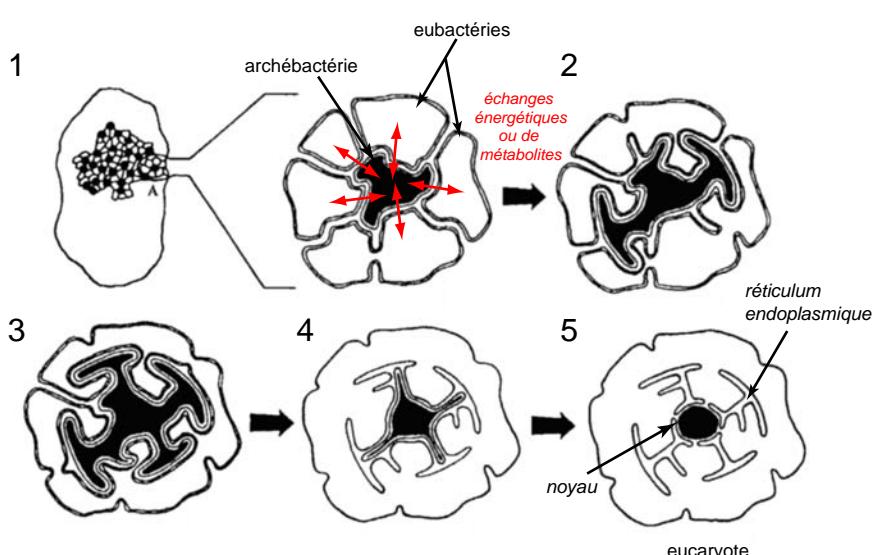
B : Coupe longitudinale en MET de cellules photoréceptrice en bâtonnet. Ces cellules présentent un organite particulier permettant la photoréception et appelé corps myéloïde.

Annexe 6. MODELES POUR L'ORIGINE DE LA COMPARTIMENTATION DES EUCHARYOTES

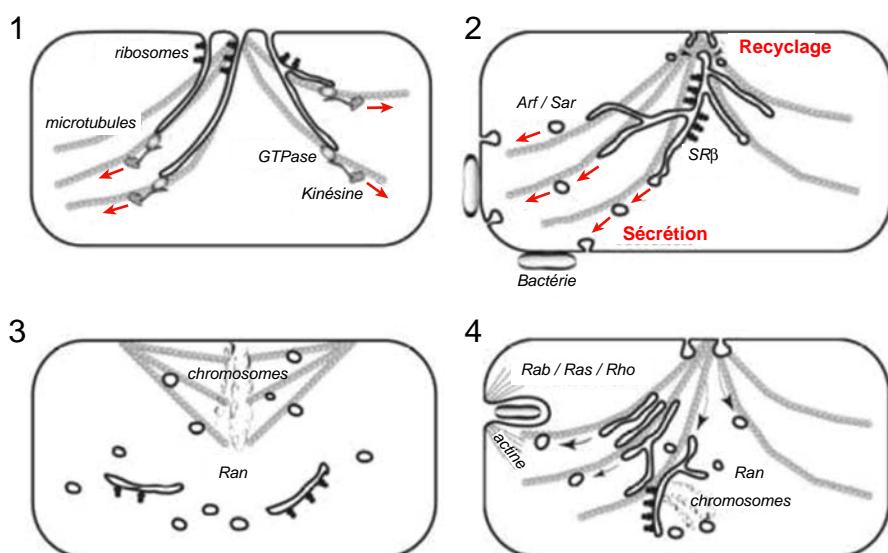
A



B



C



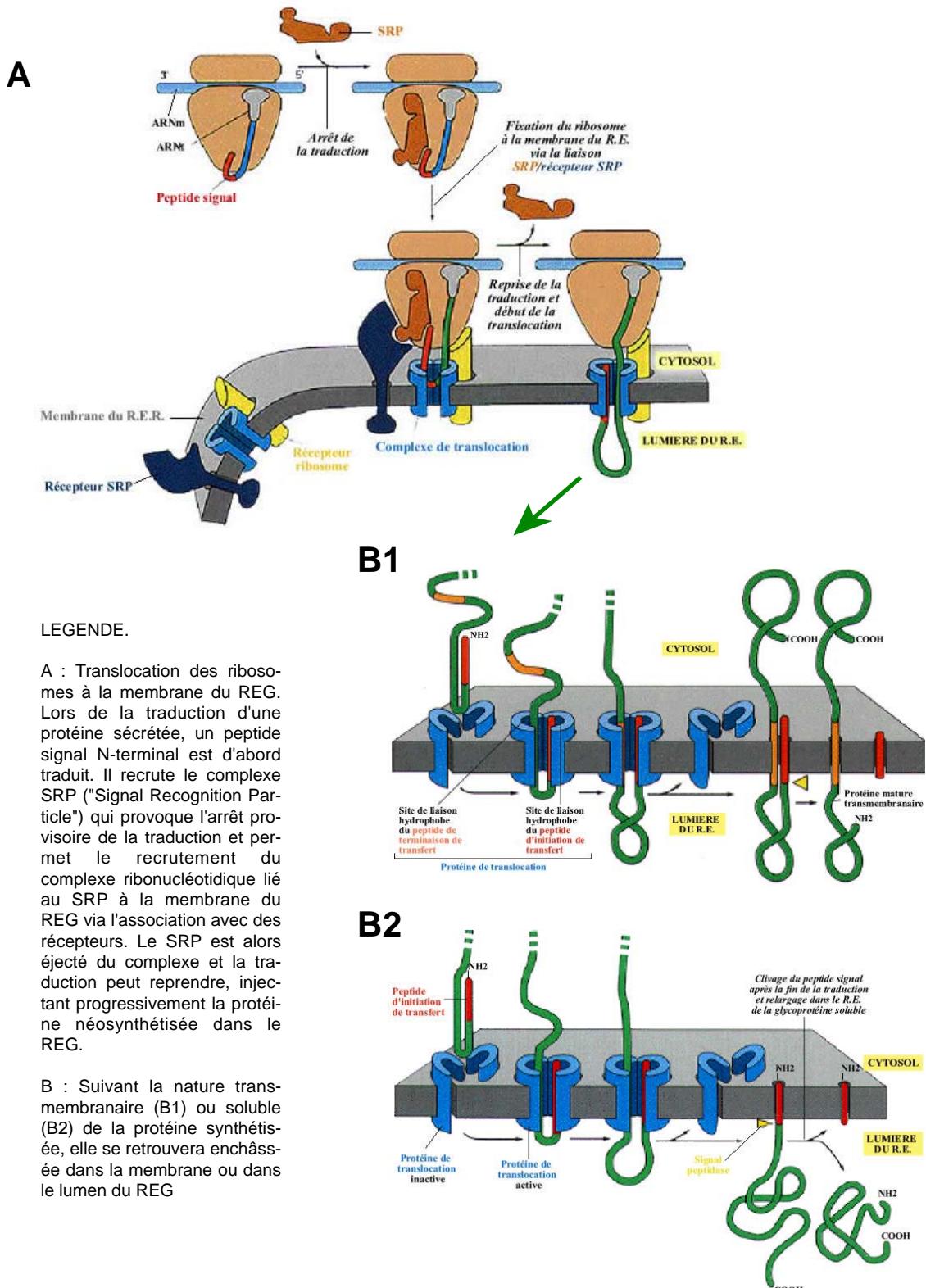
LEGENDE.

A : Hypothèse phagocytaire de l'origine de la compartmentation eucaryote.

B : Hypothèse syntrophique.

C : Hypothèse des petites GTPases.

Annexe 7. LA SYNTHESE PROTEIQUE DANS LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE.



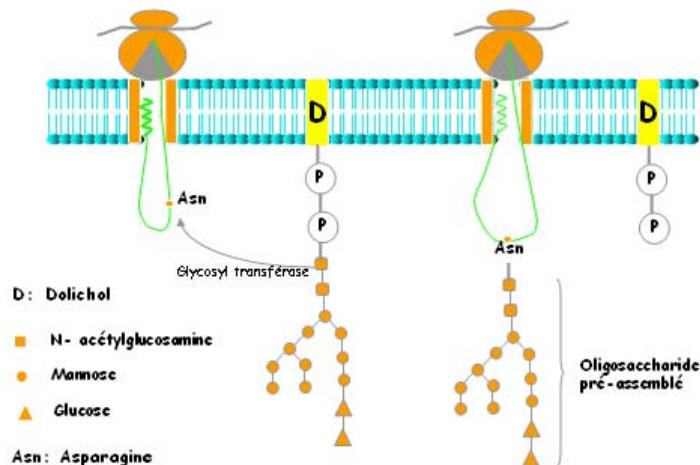
LEGENDE.

A : Translocation des ribosomes à la membrane du REG. Lors de la traduction d'une protéine sécrétée, un peptide signal N-terminal est d'abord traduit. Il recrute le complexe SRP ("Signal Recognition Particle") qui provoque l'arrêt provisoire de la traduction et permet le recrutement du complexe ribonucléotidique lié au SRP à la membrane du REG via l'association avec des récepteurs. Le SRP est alors éjecté du complexe et la traduction peut reprendre, injectant progressivement la protéine néosynthétisée dans le REG.

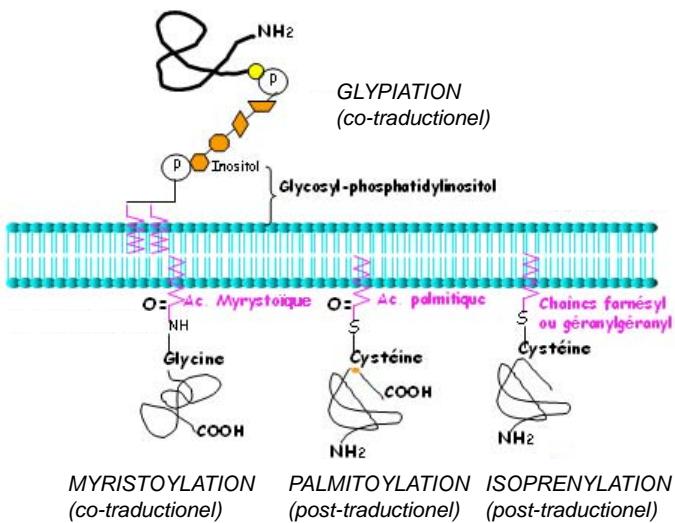
B : Suivant la nature transmembranaire (B1) ou soluble (B2) de la protéine synthétisée, elle se retrouvera enchaînée dans la membrane ou dans le lumen du REG

Annexe 8. MODIFICATIONS CO- ET POST-TRADUCTIONNELLES DES PROTEINES

A N-glycosylation au niveau du REG.



B Ancre membranaire.

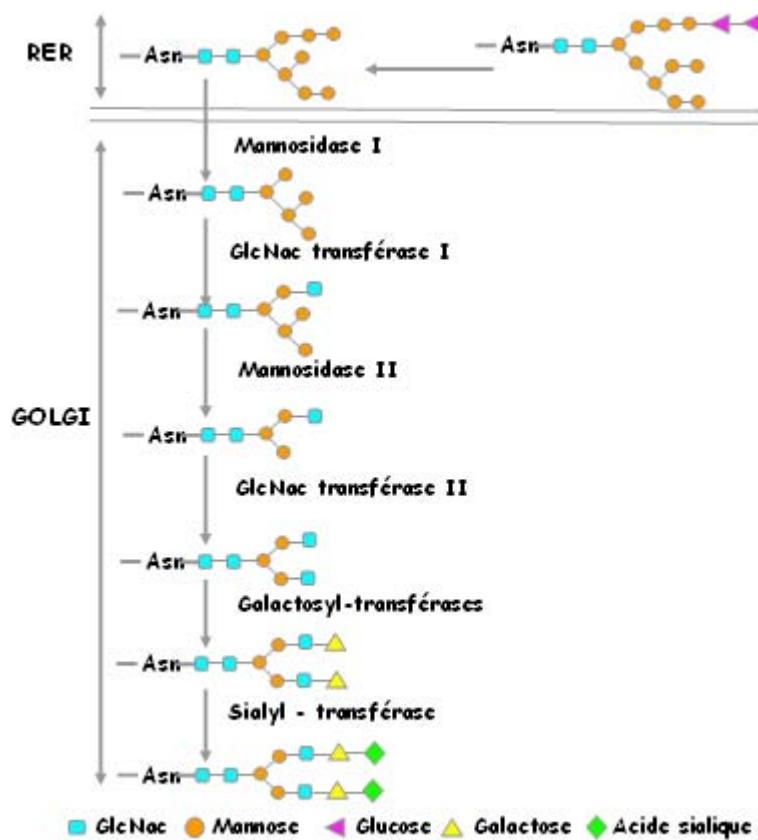


LEGENDE.

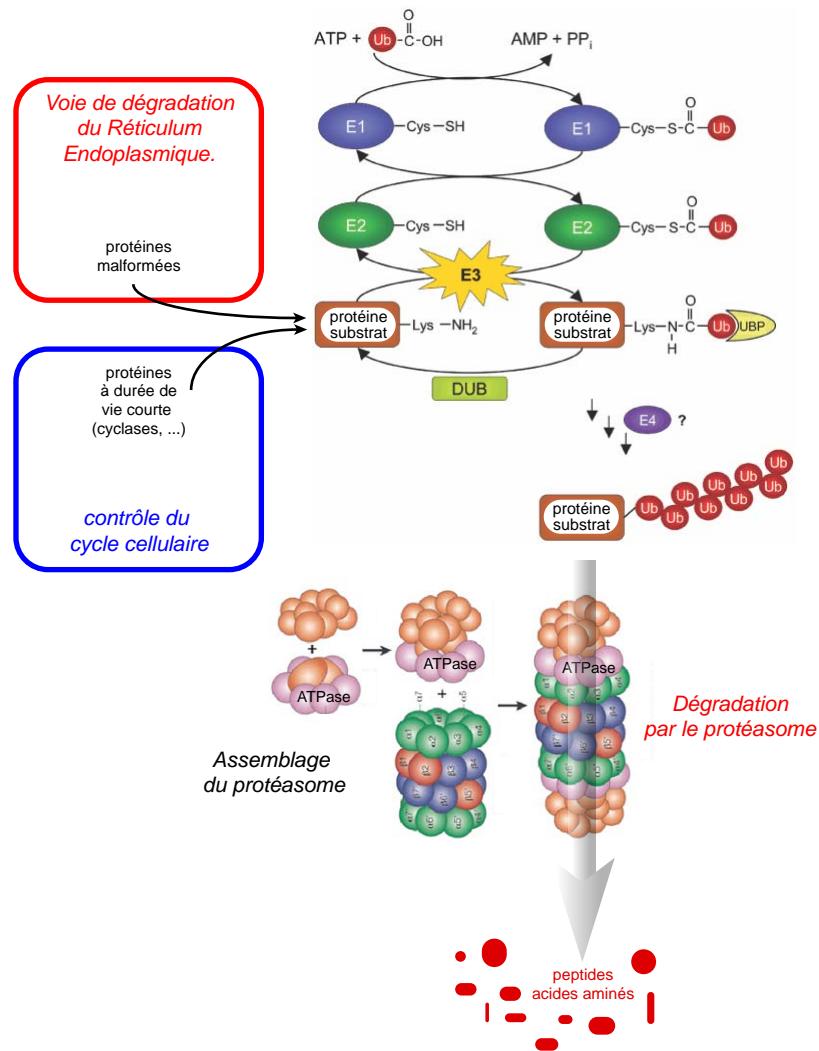
A : Les N-glycosylation sur les résidus asparaginyles (Asn) ont lieu au cours de la traduction dans le REG. Les chaînes osidiques ajoutées peuvent être modifiées ensuite dans le Golgi.

B : Modification co- et post-traductionnelles confèrent un ancrage membranaire à une protéine dépourvue de domaine transmembranaire.

Annexe 9. MODIFICATIONS DES CHAINES OSIDIQUES AU NIVEAU DU GOLGI.



Annexe 10. LA VOIE DE DEGRADATION PAR LE PROTEASOME.



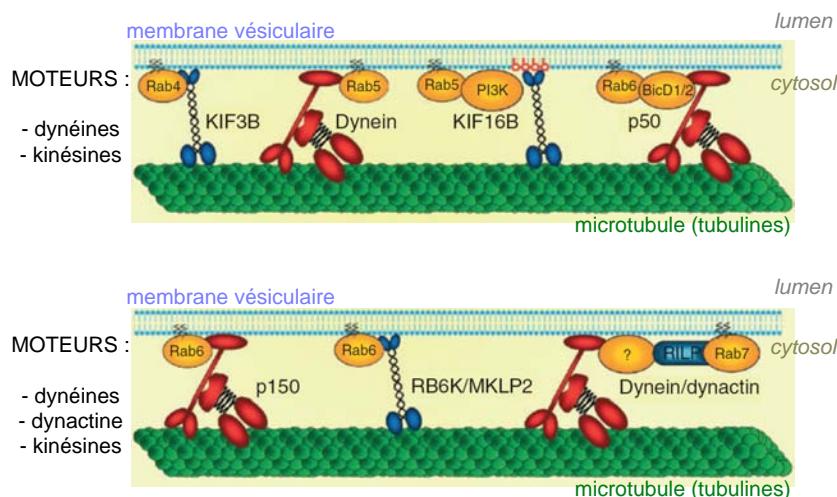
LEGENDE.

Le protéasome est un complexe protéique multimérique impliqué dans la dégradation des protéines polyubiquitinylées. La polyubiquitinylation concerne les protéines à courte demi-vie comme les cyclases, et les protéines malformées au niveau du REG par exemple. Elle est rendue possible par l'action séquentielle de 3 complexes : E1, E2, E3 et peut-être d'un quatrième à identifier E4. La monoubiquitination n'est pas un signal de dégradation en soi (cf. adressage aux endosomes et lysosomes).

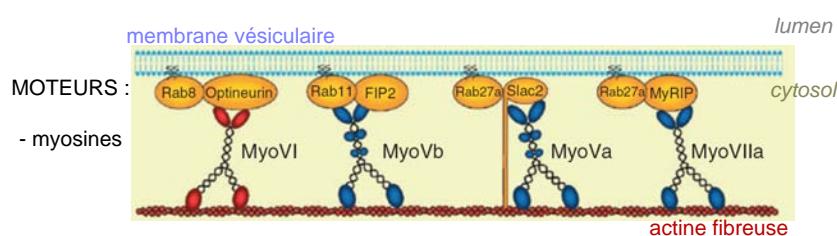
DUB : "De-ubiquitinylating" ; UBP : "Ubiquitin-Binding Protein" ; Cys : cystéine ; Lys : lysine ; Ub : Ubiquitine.

Annexe 11. ROLE DES RAB-GTPASES DANS LE TRANSPORT VESICULAIRE

A



B



C

Rab GTPase	Motor	Compartment	Interaction	Effector
Rab4	KIF3B	EE	IP	PI3K
	LIC	EE	Y2H	
Rab5	DIC	EE	IP	BicD1/2
	KIF16B	EE	No	
Rab6	p150 ^{GLUED}	Golgi	Y2H	RILP
	p50 ^{dynamitin}	Golgi	Pull down	
	RB6K/MKLP2	Golgi	Y2H, pull down	
Rab7	Dynein/dynactin	LE/Lys	Unknown	
Rab8	MyoVI	Golgi	Y2H, direct interaction	Optineurin
Rab11	MyoVb	Recycling compartment	Y2H	FIP-2
			Y2H	
Rab27a	MyoVa	Melanosome	Y2H, IP	Melanophilin/Slac2
	MyoVIIa	Melanosome	Pull down	

LEGENDE.

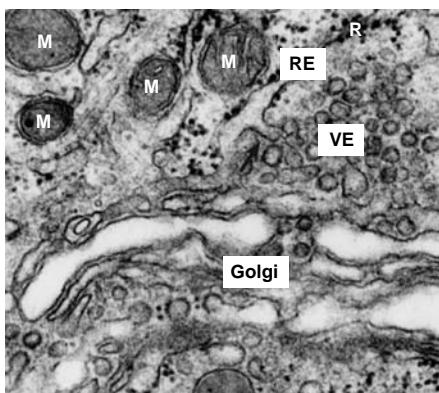
A : Rabs et moteurs moléculaires associés aux microtubules pour le transport des vésicules.

B : Rabs et moteurs moléculaires associés à l'actine fibreuse pour le transport des vésicules.

C : Tableau récapitulatif des interactions entre Rab et moteurs moléculaires, compartiment associé, méthode ayant permis la détection de l'intéraction, et effecteurs.

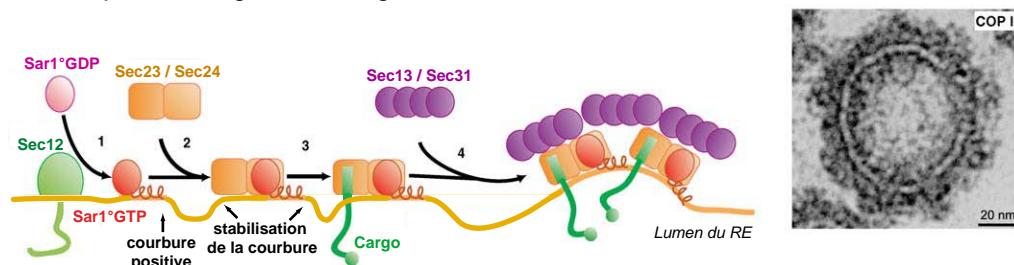
Annexe 12. ECHANGES ER - GOLGI, VESICULES A MANTEAUX COPI ET COPII

A Cellule de Langerhans (MET).

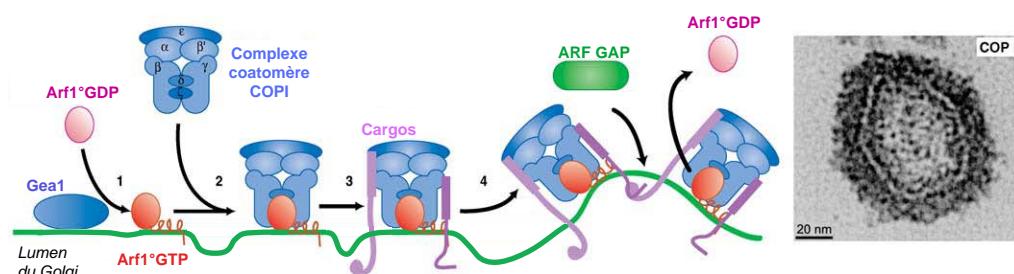


RE : Réticulum Endoplasmique
VE : Vésicules d'échange RE - Golgi
M : Mitochondries
R : Ribosomes

B Transport antérograde : bourgeonnement des vésicules COPII



C Transport rétrograde : bourgeonnement des vésicules COPI



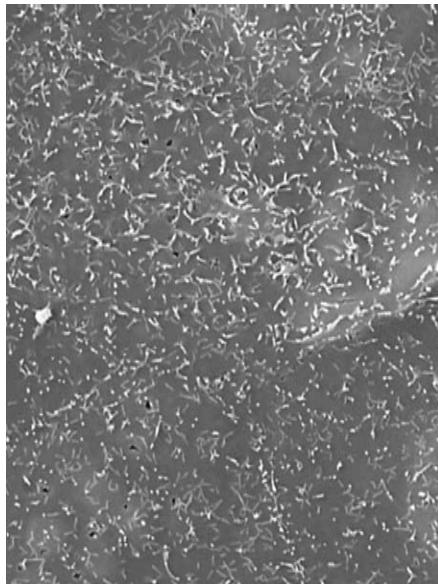
LEGENDE.

A : Zone d'échanges RE - Golgi dans une cellule de Langherans, vue en microscopie électronique à transmission (MET). De nombreuses vésicules sont visibles et assurent les échanges entre les deux compartiments. Il est impossible de distinguer ici les deux types de vésicules impliquées dans les transports antérograde et rétrograde.

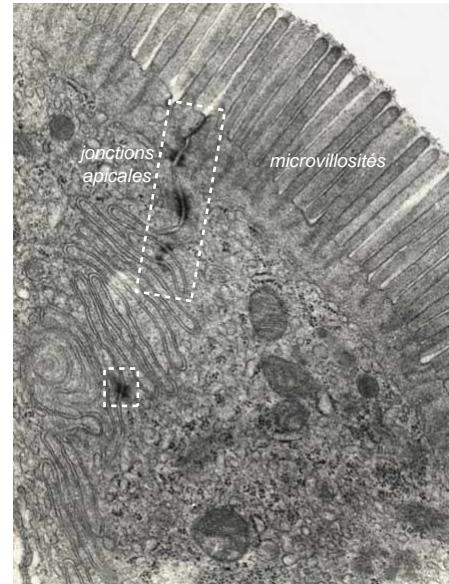
B : Biogénèse des vésicules COPII impliquées dans le transport antérograde RE-Golgi. La GEF Sec12 permet l'échange du GDP en GTP pour la petite GTPase Sar1 qui s'ancre alors de façon stable à la membrane via son domaine hydrophobe acylé, et initie une courbure membranaire. Le complexe adaptateur Sec23/24 est alors recruté, permettant la sélection des cargos et le recrutement des protéines de manteau COPII Sec13/31, qui accentuent le bourgeonnement vésiculaire. Après fission, la vésicule COPII se présente comme le cliché réalisé en MET à droite.

C : Biogénèse des vésicules COPI impliquées dans le transport rétrograde Golgi-RE. La GEF Gea1 joue le même rôle pour Arf1 que Sec12 pour Sar1. La petite GTPase Arf1-GTP recrute alors le complexe multimérique COPI qui permet le recrutement des cargos et accentue la courbure membranaire. Les étapes suivantes requièrent l'hydrolyse du GTP par Arf1 activée par ARF-GAP. Le cliché à droite représente une vésicule COPI après fission.

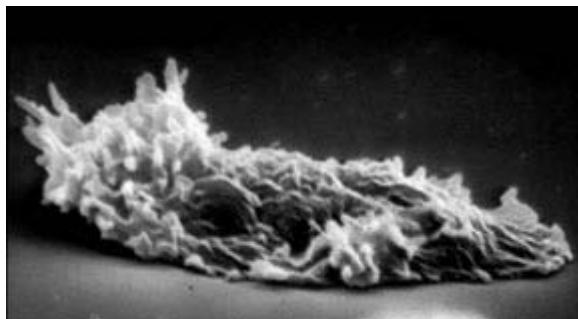
Annexe 13. QUELQUES CAS DE CELLULES POLARISEES.



Vue de la membrane apicale d'une cellule MDCK montrant les villosités apicales. (MEB)



Coupe en MET d'une cellule intestinale de rat au niveau d'une jonction apicale.



Amibe en migration (polarisation transitoire)



levure en division (polarisation transitoire)

LEGENDE.

Différentes cellules polarisées observées en microscopie électronique à balayage (MEB) ou à transmission (MET). Le groupe du haut représente des parties apicales de cellules épithéliales, donc à polarité stable. Le groupe du bas représente des cas de polarité transitoire due induite par un processus comme la migration cellulaire ou la division.

Annexe 14. SIGNAUX D'ADRESSAGE DE PROTEINES TRANSMEMBRANAIRES AUX COMPARTIMENTS ENDOLY- SOSOMAUX ET AU TRAFIC BASOLATERAL.

NPXY-type signals		
Protein	Species	Sequence
LDL receptor	Human	Tm-10-INFIDNPVYQKTT-29
LRP1 (1)	Human	Tm-21-VEIGNPTYKMYE-64
LRP1 (2)	Human	Tm-55-TNFTNPVYATLY-33
LRP1	Drosophila	Tm-43-GNFANPVYESMY-38
LRP1 (1)	C. elegans	Tm-54-TTFTNPVYELED-91
LRP1 (2)	C. elegans	Tm-140-LRVNDNPLYPDS-4
Megalin (1)	Human	Tm-70-IIIFENPMYSARD-125
Megalin (2)	Human	Tm-144-TNFENPIYAQMEE-53
Integrin β -1 (1)	Human	Tm-18-DTGENPIYKSAV-11
Integrin β -1 (2)	Human	Tm-30-TTVNNPKYEGE
Integrin β (1)	Drosophila	Tm-26-WDTENPIYKQAT-11
Integrin β (2)	Drosophila	Tm-35-STFKNPYAGK
APL1	Human	Tm-33-HGENPTYRPLE-3
APP	Human	Tm-32-NGENPTYKFFE-4
APP-like	Drosophila	Tm-38-NGENPTYKFFE-3
Insulin receptor	Human	Tm-36-YASSNPYELAS-379
EGR receptor (1)	Human	Tm-434-GSVQNPFVYHNQP-96
EGR receptor (2)	Human	Tm-462-TAVGNPEYLNTV-68
EGR receptor (3)	Human	Tm-496-ISLDNPDYQQDF-34

YXXO-type signals

Protein	Species	Sequence
LAMP-1	Human	Tm-RKRSHAGYQTI
LAMP-2a	Human	Tm-KHHHAGYEQF
LAMP-2a	Chicken	Tm-KKHHNTGYQF
LAMP-2b	Chicken	Tm-RRKSRTGYQSV
LAMP-2c	Chicken	Tm-RRKSYYAGYQTL
LAMP	Drosophila	Tm-RRRSTSRYGMSF
LAMP	Earthworm	Tm-RKRSRGGYESV
CD63	Human	Tm-KSIRSGYEV
GMP-17	Human	Tm-HCGGPRPGYETL
GMP-17	Mouse	Tm-HCRTTRAEEYETL
CD68	Human	Tm-RRRPSAYQAL
CD1b	Human	Tm-RRRSYONIP
CD1c	Human	Tm-KKHCSYQDIL
CD1d	Mouse	Tm-RRRSAYQDIR
CD1	Rat	Tm-RKRSYYQDIM
Endolyn	Rat	Tm-KFCKSKERNYHTL
Endolyn	Drosophila	Tm-KFYKARNERNYHTL
TSC403	Human	Tm-KIRLRQCSSGYQRI
TSC403	Mouse	Tm-KIQRORHQSAYQRI
Cystinosin	Human	Tm-HFCLRKRPQYDQLN
Putative solute carrier	Human	Tm-12-SLSRGSGCYKEI
TRP-2	Human	Tm-RRLRKGYTPLMET-11
HLA-DM β	Human	Tm-RRAGHSSYTPLPGS-9
LimpA	Dictyostelium	Tm-KKLRRQQKQGQYQAIINNE
Putative lysosomal protein	Dictyostelium	Tm-RSKSNQNQSYNLIQ
LIMP-II	Dictyostelium	Tm-RKTFYNNNCYNYNIN
Transferrin receptor	Human	16-PLSYTRFLSA-35-Tm
Asialoglycoprotein receptor H1	Human	MTKEYQDLQHL-29-Tm
CI-MPR	Human	Tm-22-SYKSYKVNE-132
CD-MPR	Human	Tm-40-PAAYRGVGD-16
CTLA-4	Human	Tm-10-TGVYVKMPT-16
Furin	Human	Tm-17-LISYKGLPPE-29
TGN38	Rat	Tm-23-ASDYQRNLNKL
gp41	HIV-1	Tm-13-RQGYSPLSFQT-144
Acid phosphatase	Human	Tm-RMQAQPPGYRHVADGEDHA

Acidic cluster signals

Protein	Species	Sequence
Furin	Mouse	Tm-31-QECECPSDSEEDEG-14
PC6B (1) ^a	Mouse	Tm-39-RDRDYDEDDDEDDI-36
PC6B (2)	Mouse	Tm-69-LDETEDDELEYDDES-4
PC7	Human	Tm-38-KDPDEVETES-47
CPD	Human	Tm-36-HEFQDETDETEET-6
PAM	Human	Tm-59-QEKEDDGSESEEEY-12
VMAT2	Human	Tm-35-GEDEESESD
VMAT1	Human	Tm-35-GEDESDEEPDHEE
VAMP4	Human	25-LEDDSDEEEFD-81-Tm
Glycoprotein B	HCMV	Tm-125-KDSEDEENV
Glycoprotein E	Herpes virus 3	Tm-28-FEDSESTDTEEEF-21
Nef	HIV-1 (AAL65476)	55-LEAQEEEEEV-139
Kex1p (1)	S. cerevisiae	Tm-29-ADDLESGLGAEDDLEQDEQLEG-40
Kex1p (2)	S. cerevisiae	Tm-79-TEIDESFEMTDF
Kex2p	S. cerevisiae	Tm-36-TEPEEEVEDPDFDLSDEDH-61
Vps10p	S. cerevisiae	Tm-112-FEIEEDDVPTLEEEH-37

[DE]XXX[L]-type signals		
Protein	Species	Signal
CD3- γ	Human	Tm-8-SDKQTLLPN-26
LIMP-II	Rat	Tm-11-DERAPLIRT
Nmb	Human	Tm-37-QBKDPPLLKN-7
QNR-71	Quail	Tm-37-TERNPLLKS-5
Pmel17	Human	Tm-33-GENSPLLSG-3
Tyrosinase	Human	Tm-8-EEKQPLLM-12
Tyrosinase	Medaka fish	Tm-16-GERQPLLQS-13
Tyrosinase	Chicken	Tm-8-PRIQPLLTE-13
TRP-1	Goldfish	Tm-7-EGRQPLLGD-15
TRP-1	Human	Tm-7-EANQPLLTD-20
TRP-1	Chicken	Tm-7-ELHQPLLTD-20
TRP-2	Zebrafish	Tm-5-REFEPLLNA-11
VMAT2	Human	Tm-6-EEKMAILMD-29
VMAT1	Human	Tm-6-EERKLAISQ-32
VAcT	Mouse	Tm-10-SERDVLLDE-42
VAMP4	Human	19-SERRNLLED-88-Tm
Neonatal FcR	Rat	Tm-16-DDSGDLLPG-19
CD4	Human	Tm-12-SQIKRLLSE-17
CD4	Cat	Tm-12-SHIKRLLSE-17
GLUT4	Mouse	Tm-17-RRTPSLLEQ-17
GLUT4	Human	Tm-17-HRTPSLLEQ-17
IRAP	Rat	46-EPRGSRLLV-53-Tm
Ii	Human	MDDQRDLISNNHEQLPMLGR-11-Tm
Ii	Mouse	MDDQRDLISNNHEQLPILGN-10-Tm
Ii	Chicken	MAEEQRDLISSDGSSGVLP-12-Tm
Ii-1	Zebrafish	MEPDHQNESLIGRVPFAETILGR-12-Tm
Ii-2	Zebrafish	MSSEGNETPLISDQSSVNMGQPQ-8-Tm
Lamp	Trypanosome	Tm-RPRRRTTEEDELLPEEAECILDQPN
Menkes protein	Human	Tm-74-PDKHSLLVGDFREDDDTAL
NPC1	Human	Tm-13-TERERLLNF
AQP4	Human	Tm-32-VETDDIL-29
RME-2	C. elegans	Tm-104-FENDSSL
Vam3p	S. cerevisiae	153-NBQSPLLHN-121-Tm
ALP	S. cerevisiae	7-SEQTRLVP-18-Tm
Gap1p	S. cerevisiae	Tm-23-EVDLLLK-24

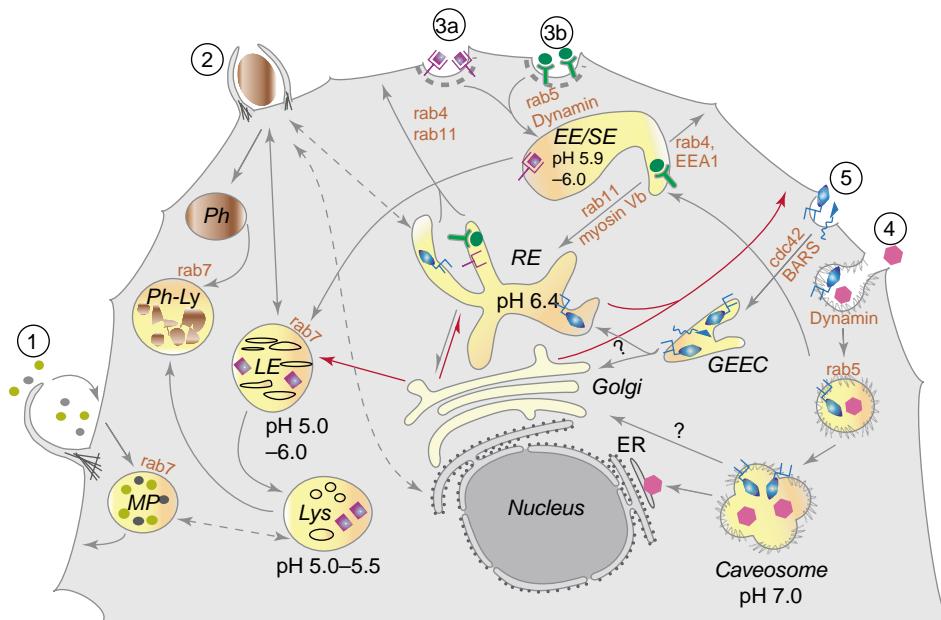
DXXLL-type dileucine-based signals

Protein	Species	Sequence
CI-MPR	Human	Tm-151-SFHDD\$DEDDLHI
CI-MPR	Bovine	Tm-150-TFHDD\$DEDDLHV
CI-MPR	Rabbit	Tm-151-SFHDD\$DEDDLN
CI-MPR	Chicken	Tm-148-SFHDD\$DEDDLN
CD-MPR	Human	Tm-54-EESEERDDHLLPM
CD-MPR	Chicken	Tm-54-DESEERDDHLLPM
Sortilin	Human	Tm-41-GYHDD\$DEDDLE
SorLA	Human	Tm-41-ITGPSDDVPMVIA
Head-activator BP	Hydra	Tm-41-INRFSDDPEPLVVA
LRP3	Human	Tm-237-MLRASDDEALLVC
ST7	Human	Tm-330-KNETS\$DEALLLC
LRP10	Mouse	Tm-235-WVVEAEDEPLLA
LRP10	Human	Tm-237-WVARAEDEPLLT
Beta-secretase	Human	Tm-9-HDDFADDISLLK
Mutoclipin-1	Mouse	Tm-43-GRD\$PEDHSLLVN
Nonclassical MHC-I	Deer mouse	Tm-6-VRCH\$PEDDRLLG
FLJ30532	Human	Tm-83-HRVSQDDLLLTS
GGA1	Human	350-A\$VSLLDELMSL-275
GGA1	Human	415-ASSCLDDLLLGK-211
GGA2	Human	408-VQNPSPADRNLDDL-192
GGA3	Human	384-NALSWLDEELLC-326
GGA	Drosophila	447-TVDSIDDVPLLS-116

LEGENDE.

Signaux contenus dans la séquence peptidique des protéines adressées aux compartiments du trafic endolysosomal. Ces étiquettes sont reconnues par des adaptateurs également impliqués dans le trafic à la membrane basolatérale et sont donc retrouvées dans les protéines qui y sont destinées.

Annexe 15. DIFFERENTS MODES D'ENDOCYTOSE DANS LES CELLULES NON POLARISEES



●	Transférine
Y	Récepteur Transférine
■	LDL
□	Récepteur aux LDLs
◆	IgA
Y	plgR
◇	SV40
◆	GPI-AP
—	Toxine du Choléra
---	Clathrine
~~~~~	Cavéoline
~~~~~	filaments d'actine
TT	v 5 intégrine

LEGENDE.

Différents modes d'endocytose sont récapitulés ici, avec les récepteurs et protéines qui ont permis leur étude, indiqués dans l'encart à gauche.

- 1) La macropinocytose, généralement induite par des facteurs de croissance, permet l'internalisation aspécifique de contenu extracellulaire dans les macropinosomes (MP).
- 2) La phagocytose permet l'internalisation de corps de grosse taille (comme des bactéries pour les macrophages) par l'émission de pseudopodes. Ph : phagosome, Ph-Ly : phagolysosome, Lys : lysosome, LE : "late endosome", RE : "recycling endosome".
- 3) Endocytose médiée des récepteurs et par la clathrine. Les vésicules formées sont adressées aux endosomes précoce ou "early endosomes/sorting endosomes" (EE/SE) pour être dégradés vers le LE ou recyclé vers le RE.
- 4) Endocytose médiée par les cavéoles, aboutissant dans des cavosomes pour un recyclage au niveau du réticulum endoplasmique (ER) ou du Golgi. Concerne les protéines ancrées au GPI (GPI-APs) et le virus SV40.
- 5) Endocytose indépendante de la clathrine ou des cavéoles. Concerne les GPI-APs et la toxine du choléra, qui peuvent être internalisées dans des "lipid rafts" de 40 à 50 nm au niveau des endosomes précoce enrichis en GPI-APs ("GPI-APs enriched endosomal compartments", GEEC).

Annexe 16 CARACTERISTIQUES DES GENOMES D'ORGANISMES MODELES.

A

	Arabette	Nématode	Drosophile	Souris	Homme
LINE/SINE	0,50%	0,40%	4,70%	28%	28%
Séquences type rétrovirus	4,80%	0%	6,40%	10%	7%
Séquences type transposons	5,10%	5,30%	3,60%	1%	3%
Total	10,50%	6,50%	14,90%	38%	38%

B

	Arabette	Nématode	Drosophile	Levure	Homme
taille physique (Mb)	125	100	180	13	3.000
taille moyenne d'un cM (kb)	220	500	300	3	800
teneur en [G+C]	41%	36%	nd	38%	41%
nombre de gènes	25.500	19.100	13.600	6.200	~30.000
fraction codante	29%	27%	13%	68%	1,40%
nombre moyen d'exons par gène	5,2	5,5	4,6	1,04	8,7
taille des gènes (kb)	2,1	2,7	3	1,4	28
taille moyenne du codant (introns exclus)	1.300	1.311	1.497	1.450	1.340
taille moyenne des exons (pb)	250	218	150	1.450	145
taille moyenne des introns (pb)	168	267	487	500	~3.300
fréquence des gènes (par kb)	4,5	4,8 / 6	9	2	~100
nombre d'ARNt	589	584	284	273	535
Localisation chromosomique des NOR	2, 4	1	X et Y	12	13, 14, 15, 21, 22

<http://www.cns.fr/externe/Francais/Sequencage/#1.2>

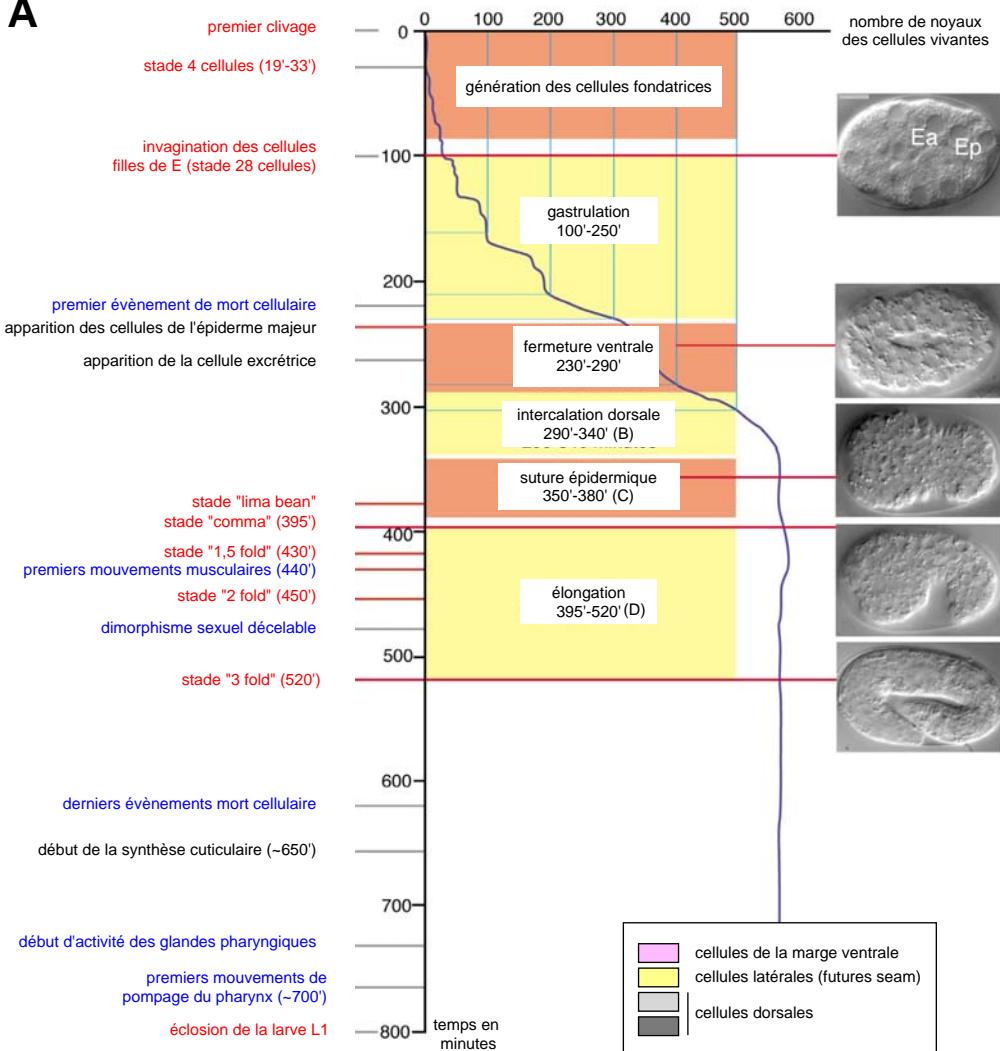
LEGENDE.

A : Analyse des contenus en séquences répétées d'éléments transposables des génomes de quelques organismes modèles. Le génome du nématode *C. elegans* est très pauvre en éléments transposables.

B : Différentes caractéristiques génomiques des mêmes organismes. La fraction codante du génome du nématode est importante comparée à celle des autres animaux, en partie du fait que les séquences introniques sont plus courtes chez cet organisme.

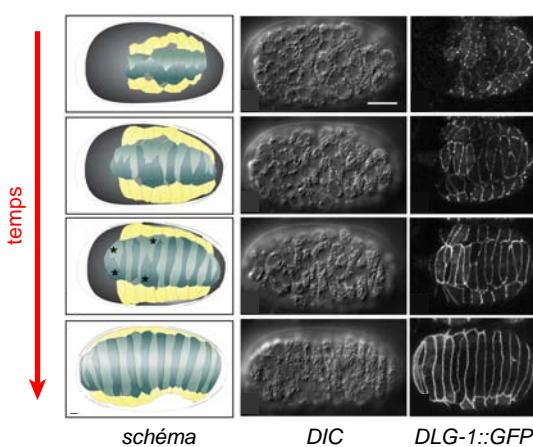
Annexe 17. DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET MORPOGENESE EPIDERMIQUE

A



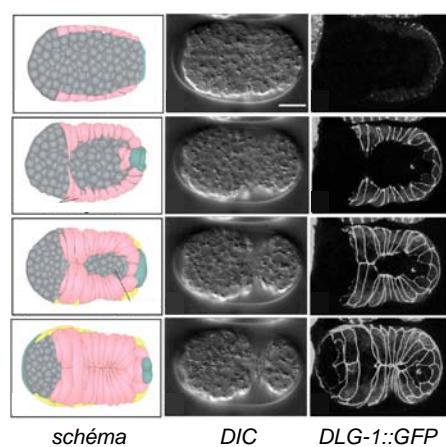
B

Intercalation dorsale



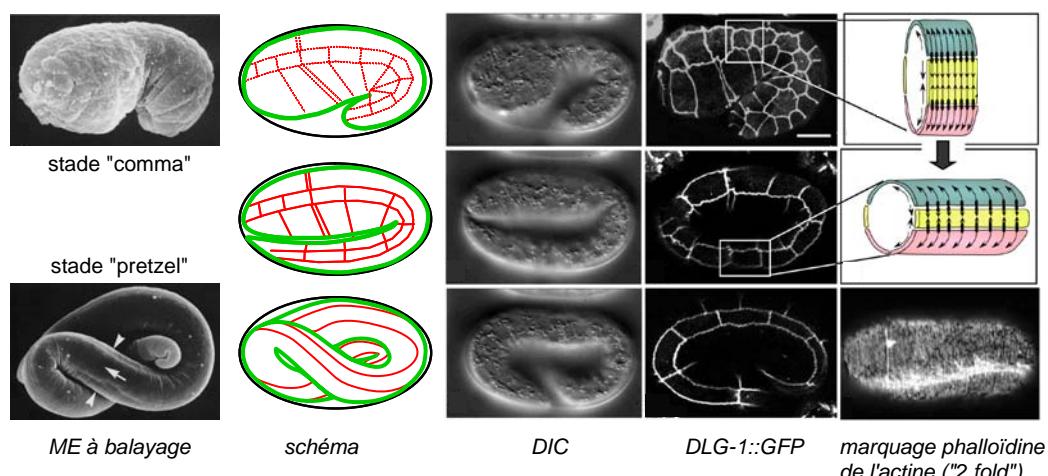
C

Suture épidermique



Annexe 17. DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET MORPOGENESE EPIDERMIQUE (suite)

D Elongation sans divisions cellulaires.



LEGENDE.

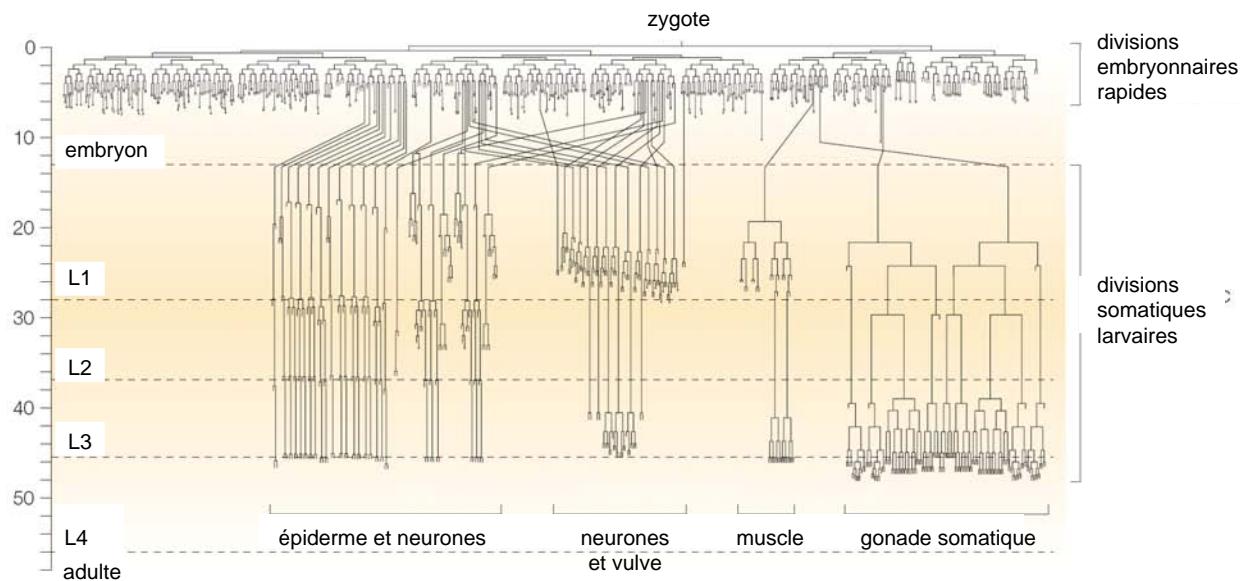
A : Développement embryonnaire de *C. elegans* de la première division cellulaire à l'éclosion de la larve L1 de 558 cellules. le nombre de cellules est reporté en abscisse et le temps en ordonnée. Quelques événements clefs, processus morphogénétiques et stades développementaux sont indiqués.

B : Intercalation des cellules dorsales. C'est le premier mouvement morphogénétique des cellules épidermiques dorsales qui induit un faible allongement de l'embryon et sa forme en haricot. Un schéma représente les cellules épidermiques dorsales (gris) et latérales (jaune pâle) dans les panneaux de gauche. Les astérisques indiquent les cellules en cours d'intercalation. La représentation centrale est une vue en microscopie optique à contraste interférentiel (DIC), et les panneaux de gauche montrent les jonctions apicales des cellules de l'épiderme visualisées en épifluorescence grâce au marqueur DLG-1::GFP (orthologue de "Disc-large").

C : Suture épidermique. Évènement morphogénétique au cours duquel les deux rangées de cellules ventrales migrent et s'étendent ventralement pour enrober les cellules endodermiques et mésodermiques. Ces deux rangées de cellules ventrales se contactent puis fusionnent. Un schéma d'interprétation en vue ventrale est proposé dans les panneaux de gauche, le DIC dans les panneaux centraux, et le marquage des jonctions apicales des cellules épidermiques ventral est révélé par DLG-1::GFP (panneaux de droite).

D : Elongation de l'embryon. L'élongation est un processus purement morphogénétique qui ne fait intervenir aucune division cellulaire. Les cellules épidermiques se contractent circonférentiellement induisant ainsi un allongement de tout l'embryon selon l'axe antéro-postérieur. La contrainte de la coquille force l'embryon à se replier en 2 (stade "2 fold") puis en 3 (stade "3 fold"), puis ~3,5 (stade "pretzel"). Les panneaux les plus à gauche représentent les deux stades encadrant le processus d'élongation, visualisés en microscopie électronique à balayage. Viennent ensuite les schémas d'interprétation, puis la visualisation en DIC, et le marquage DLG-1, en vue latérale. Les panneaux les plus à droite schématisent le changement de forme subit par les cellules épidermiques lors de l'élongation et les tensions circonférentielles auxquelles elles sont soumises (flèches). Le dernier panneau en bas à droite montre un marquage d'embryon "2fold" à la phalloïdine qui révèle que l'actine des cellules épidermiques est organisée en fibres circonférentielles lors de l'élongation.

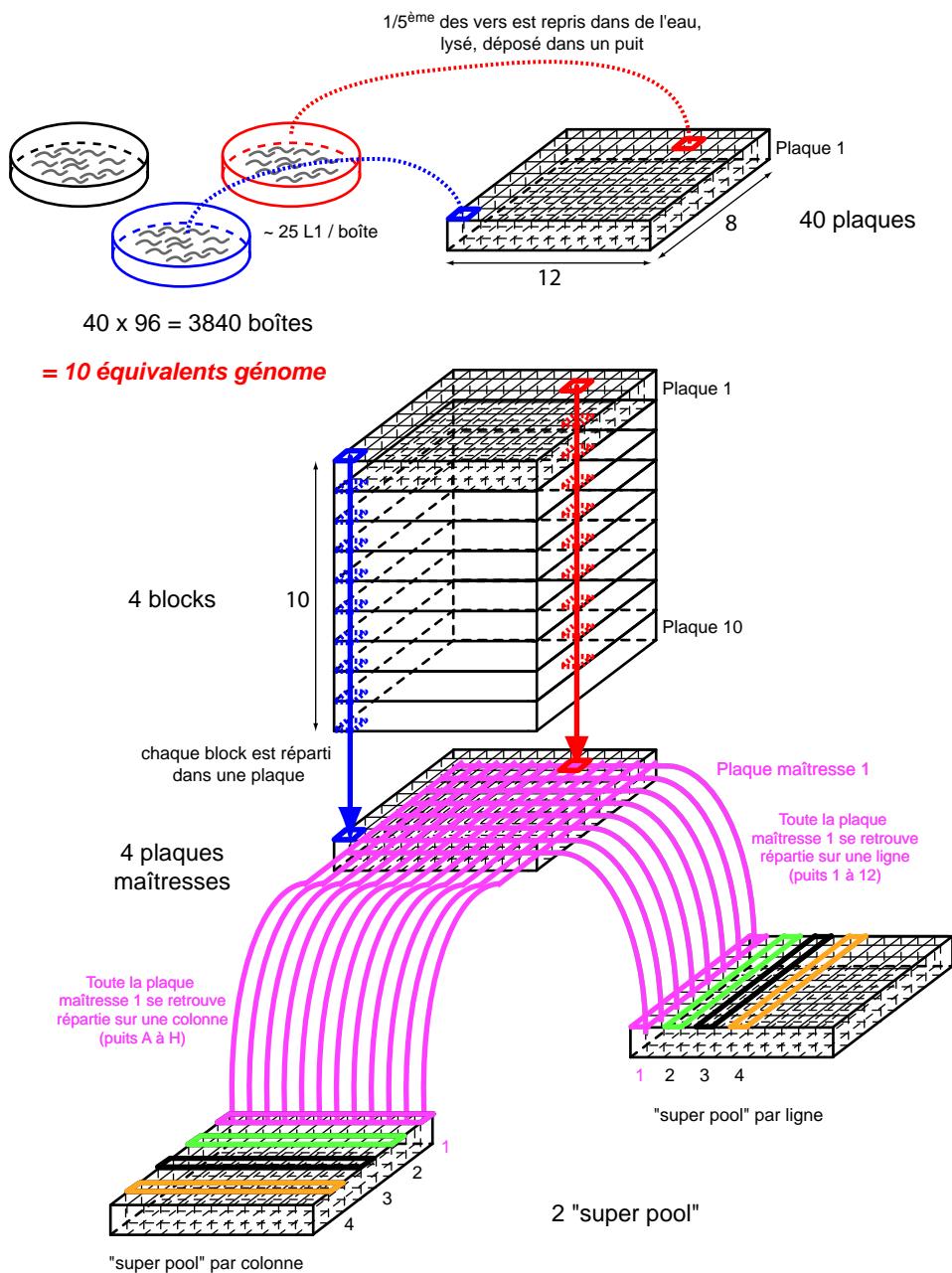
Annexe 18. LE LIGNAGE DE *C. elegans*.



LEGENDE.

Lignage complet de l'hermaphrodite *C. elegans*. La plupart des divisions somatiques ont lieu au stade embryonnaire. Cependant, les cellules de plusieurs tissus, principalement épithéliaux (épiderme, vulve, gonade somatique), se divisent encore jusqu'au stade L4.

Annexe 19. ORGANISATION DE LA BANQUE DE LYSATS DE VERS APRES MUTAGENESE.

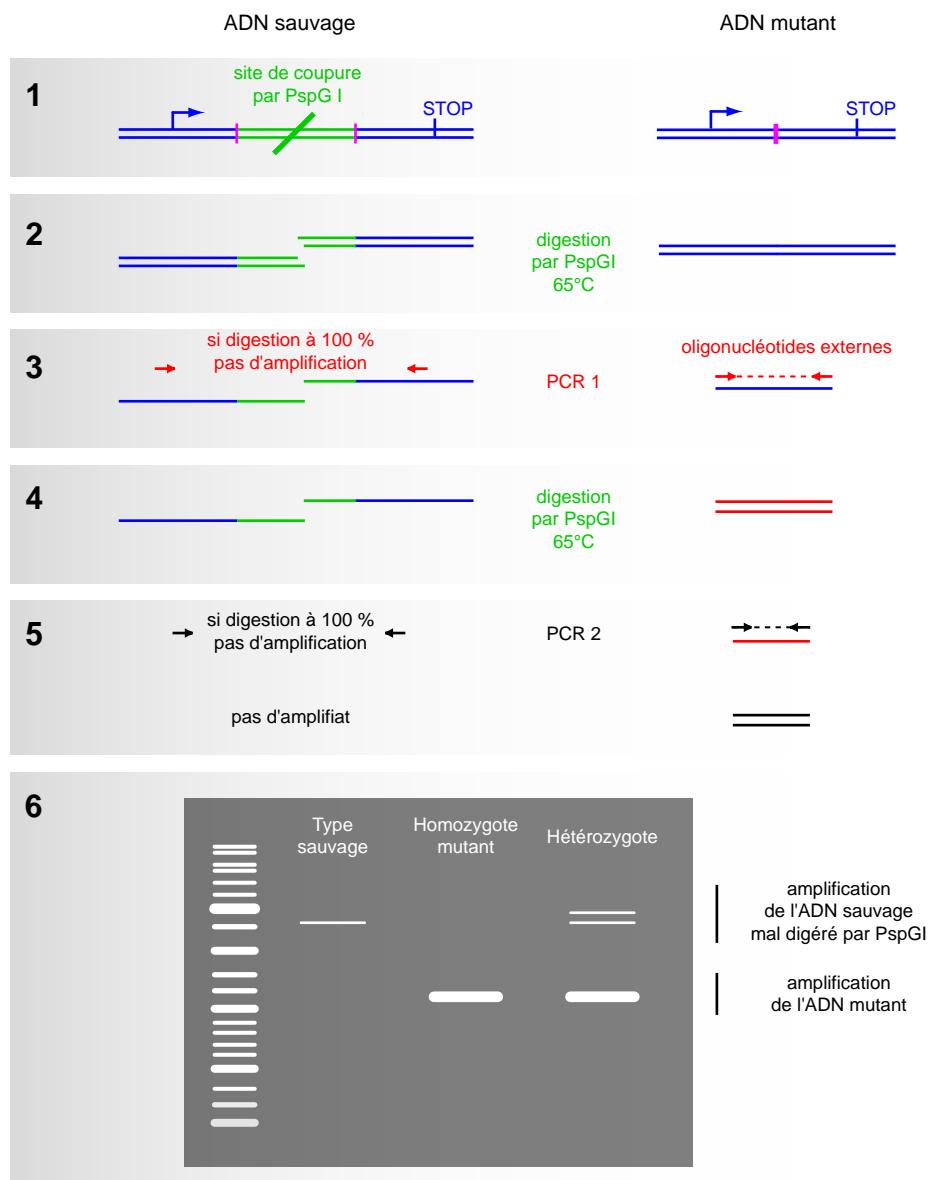


LEGENDE.

Chaque lysat obtenu à partir d'une boîte sur laquelle 25 L1 (génération F1) issus de parents mutagénétisés (P0) ont été posés pendant 5 jours est déposé dans un puit d'une plaque de 96 puits. Il se voit attribuer un numéro de plaque et de coordonnées sur cette plaque, par exemple : plaque 2, puit B8, sera noté P2-B8. La boîte de vers dont est issu ce lysat est également annotée ainsi.

Des systèmes de "pools" sont ensuite réalisés pour cibler plus rapidement les délétions. On "poole" généralement 10 plaques ensemble : tous les puits A1 ensemble...B28 ensemble...H12 ensemble. Chaque nouvelle plaque dite maîtresse (M) est annotée (M1 à M4), et ainsi le puit M1-B8 correspondra à un mélange des puits P1-B8, P2-B8, P3-B8, (...), P10-B8. On peut alors cibler sur les plaques M directement ou bien "pooler" les contenus des plaques M1 à 4 de différentes façons (ici en lignes et en colonnes) et on réalisera alors la première étape du crible sur des "super pools". Ici si on détecte une délétion de même taille dans la ligne B et la colonne 8 des deux "super pools" pour la plaque M1, alors la délétion se trouve dans M1-B8, donc dans P1-B8, P2-B8, (...), ou bien P10-B8.

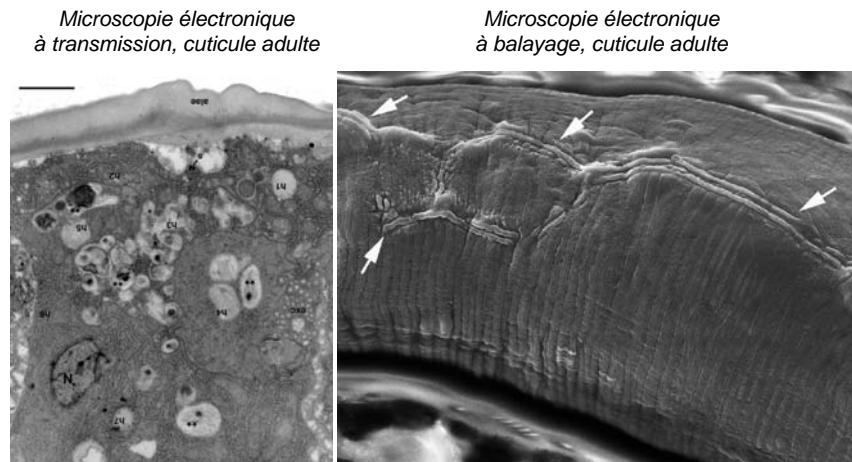
Annexe 20. TECHNIQUE DE CRIBLAGE PAR PCR EN UTILISANT UNE ENZYME DE RESTRICTION THERMORESISTANTE



LEGENDE.

Principe du criblage par PCR en utilisant l'enzyme thermorésistante PspGI. Au départ la région génétique ciblée contient un site de restriction pour PspGI. On va chercher à détecter une délétion qui a enlevé la partie du gène contenant ce site de restriction. La digestion par PspGI ne va toucher que les fragments d'ADN sauvages, et va ainsi prévenir l'amplification de la bande sauvage, pour favoriser celle de la délétion. Cett technique permet d'augmenter la détectabilité d'une délétion, et donc de cibler des banques de lysats plus complexes. Concernant le choix de l'enzyme, il faut qu'elle soit si possible thermorésistante, qu'elle coupe assez fréquemment pour qu'on puisse trouver un site dans le gène d'intérêt, et qu'une petite quantité (0,1 à 0,5 U) soit suffisante pour digérer en 1 à 2h un amplifiat PCR (en général de 25 µL).

Annexe 21. MUTANTS DE FUSION INTERCELLULAIRE ET DEFAUTS DE MORPHOGENESE CUTICULAIRE



LEGENDE.

Le mutant de fusion eff-1 présente des défauts de morphogenèse des cellules épidermales qui se traduisent par un patron cuticulaire anormal, particulièrement au niveau des alae.

ANNEXE 22. NOTES TECHNIQUES ET REMARQUES

A. Définition des classes de phénotypes des mutants hypomorphes *vha-5*.

Diverses observations que nous n'avons pas rapportées dans l'article ont renforcé la définition des classes de mutants. En particulier, les mutants « cuticule » et « mixte » se répartissent plus aléatoirement sur les boîtes de pétri, au lieu de se concentrer dans les zones où leur nourriture (les bactéries OP50) est concentrée, ce qui est classiquement interprétable comme un défaut de chimiosensation, révélant que malgré l'absence de défauts évidents des cellules supports des organes chimiosensoriels, celles-ci sont probablement affectées par ces mutations. Bien qu'assez net, je n'ai pas quantifié ce phénotype, ni réalisé de tests de chimiosensation sur ces mutants car nous avons concentré nos analyses sur l'épiderme majeur d'un côté et la cellule excrétrice de l'autre.

D'autres phénotypes sont très évidents dès que l'on s'écarte de la température optimale de 20°C. En effet ces mêmes mutants « cuticule » et « mixte » sont sensibles au froid (15°C) et à la chaleur (25°C), conditions dans lesquelles ils acquièrent des phénotypes Dpy (pour « Dumpy » : court et épais), Egl (pour « Egg-laying defect » : défaut de ponte, les embryons s'accumulent dans l'utérus), Pvl (pour « Protruding vulva » : vulve proéminente) assez prononcés. Ici, les phénotypes Egl et Pvl sont probablement les conséquences d'un même défaut fonctionnel qui pourrait être un problème de sécrétion ou d'inactivité de protéines secrétées par l'épithélium de la vulve [Michaux, 2000 #377]{Brooks, 2003 #1197}. Quant à la petite taille et à la corpulence qui caractérisent le phénotype Dpy, ce sont clairement des défauts associés à des problèmes de sécrétion ou de maturation de constituants de la cuticule (cas de *dpy-3*, *dpy-7*, *dpy-9*, *dpy-10*).

B. Sélection et clonage des gènes warthog.

J'ai sélectionné quelques gènes warthog (*wrt-1*, -2, -3, -4, -5, -6, -8) et groundhog (grd-1 et grd-2) d'intérêt sur la base de leur expression épithéliale (*wrt-1*, -2, -3, -4, -5, -6, -8) et du fait que leurs données de « microarray » {Kim, 2001 #2677} coïncidaient avec celle du gène *che-14* (*wrt-2*, -4, -6 et -8 se trouvent dans la montagne 14, comme *che-14* : http://www.wormbase.org/db/gene/expr_profile?name=F56H1.1;class=Expr_profile) J'ai ainsi cloné *wrt-1*, *wrt-2*, *wrt-4*, *wrt-5*, *wrt-8* avec leurs séquences régulatrices endogènes, et réalisé pour *wrt-2* et *wrt-8* des fusions traductionnelles en insérant la GFP en N-ter dans une région protéique peu conservée, en aval du site de clivage du peptide signal, et en amont du site d'autoclavage du domaine « Hint », espérant ainsi obtenir une protéine fonctionnelle secrétée fusionnée à la GFP.

Par la suite, j'ai ré-établi les 6 lignées *vha-5* mutantes d'intérêt en leur faisant exprimer plus ou moins fortement les transgéniques *wrt-2 ::gfp ::wrt-2* et *wrt-8 ::gfp ::wrt-8* (injections des transgéniques à 15 ng/µL, 20 ng/µL, 30 ng/µL, 100 ng/µL). Les concentrations les plus basses de transgéniques (15 et 20 ng/µL) ne permettaient pas une expression suffisante pour l'observation en épifluorescence. La concentration de 100 ng/µL induisait une stérilité importante et les lignées obtenues ont rapidement perdu l'expression du transgène. Seules les lignées obtenues après une injection à 30 ng/µL présentaient un niveau d'expression satisfaisant et stable.

C. Comment maintenir des niveaux d'expression suffisants pour l'observation ?

En ce qui concerne l'expression des transgéniques *wrt-2 ::gfp ::wrt-2* et *wrt-8 ::gfp ::wrt-8*, il faut souligner que celle-ci avait tendance à disparaître en contexte sauvage, hétérozygote ou mutant pour différents gènes. Ce qui a grandement facilité le maintien de lignées conservant une bonne expression de tels transgéniques pour les mutants *vha-5* par exemple, c'est que pour les obtenir, j'ai systématiquement réinjecté en même temps le transgène d'intérêt et la construction mutante *vha-5 ::rfp* souhaitée, en contexte hétérozygote pour *vha-5(mc38)/+*, puis ré-isolé des homozygotes *vha-5(mc38)* sauvés. Comme les transgéniques *wrt-2 ::gfp ::wrt-2* / *wrt-8 ::gfp ::wrt-8* et *vha-5 ::rfp* forment dans ce cas un seul amas extrachromosomique, et que celui-ci est requis pour la survie, les seuls homozygotes *vha-5(mc38)* capables d'atteindre l'âge adulte ont forcément maintenu des niveaux de transmission et d'expression de l'amas extrachromosomique conséquents. En revanche ceci n'est pas vrai pour les hétérozygotes transgéniques *vha-5(mc38)/+* qui perdent parfois rapidement l'expression de l'amas chromosomal (en 2 à 4 générations), et que j'ai du réobtenir à diverses reprises en recroisant une souche homozygote transgénique par des mâles sauvages.

D. Effet de la famine ?

De façon très intéressante, en situation de famine, les mutants « cuticule » et « mixte » sont bien moins Dpy. J'interpréterais cela ainsi : la famine induisant une dissociation de la V-ATPase, permettrait aux secteurs V0 « mutés » libérés de s'associer plus fréquemment (puisque plus nombreux qu'en situation normale), ce qui compenserait leur inefficacité, d'autant que l'activité sécrétoire V0-dépendante serait réduite en conditions de famine puisque la croissance de l'animal est limitée.

E. Limites de l'approche ARNi au stade adulte.

Par rapport aux expériences d'ARNi, j'ai évoqué le fait que les cellules supports semblent assez résistantes à cet effet alors que le canal excréteur est facilement touché. En ce qui concerne l'épiderme, il est quant à lui peu sensible à l'ARNi contre les sous-unités de la V-ATPase passé le stade L1, puisque je n'ai jamais obtenu de disparition de la fluorescence de VHA-8 ou de VHA-5 après exposition tardive (post L1) à l'ARNi de *vha-8* et *vha-5* respectivement. Ceci a donc rendu impossible l'investigation de la sécrétion cuticulaire en contexte ARNi pour les différentes sous-unités de V-ATPase, chez l'adulte. Il est aussi possible que la V-ATPase à la membrane apicale soit un complexe protéique très stable dans le temps (rarement dégradé et renouvelé), qu'il est difficile d'éliminer en comptant sur un effet de type ARNi.