



# **Régulation des processus cellulaires par Huntingtin interacting protein 1-related (HIP1R)**

**Mémoire**

**Gabrielle Larocque**

**Maîtrise en médecine expérimentale de l'Université Laval  
offert en extension à l'Université du Québec à Chicoutimi**

Maître ès Sciences (M.Sc.)

Département des sciences de la santé  
Université du Québec à Chicoutimi  
Chicoutimi, Canada

Faculté de médecine  
Université Laval  
Québec, Canada

© Gabrielle Larocque, 2014



## **RÉSUMÉ DU MÉMOIRE**

HIP1R (Huntingtin interacting protein 1-related) a des rôles dans l'endocytose médiée par la clathrine, l'apoptose et la mitose. Elle induit l'assemblage de la clathrine, régule la polymérisation de l'actine, contribue au clivage de la caspase-9 et aide l'ancrage des chromosomes sur les microtubules lors de la métaphase. Les domaines protéiques responsables de ces contributions et les facteurs permettant à HIP1R de changer de rôle ne sont pas encore bien connus. Nous avons utilisé la technique du knock-down et nous avons réintroduit des versions mutées ou tronquées d'HIP1R pour caractériser ses rôles en modifiant ses liaisons avec ses partenaires. Les résultats indiqueraient qu'HIP1R participe principalement à l'internalisation des plaques de clathrine et qu'HIP1R n'induit pas l'activation de la caspase-3. Finalement, nous avons montré que la liaison d'HIP1R avec la clathrine lui confère son rôle lors de la mitose lui permettant ainsi de se localiser sur les microtubules pendant la métaphase.



## TABLE DES MATIÈRES

Résumé du mémoire .....	iii
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	vii
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations .....	xi
Remerciements .....	xiii
Chapitre 1 .....	1
Introduction .....	1
1.1 Huntingtin interacting protein 1-related (HIP1R).....	1
Mise en évidence de la protéine .....	1
Structure de la protéine.....	1
1.2 Mécanismes cellulaires dans lesquels HIP1R est impliquée .....	3
L'endocytose médiée par la clathrine .....	3
HIP1R dans l'EMC.....	5
La mitose .....	5
Les étapes principales de la mitose.....	5
Le contrôle de la mitose.....	7
L'endocytose durant la mitose .....	8
HIP1R dans la mitose .....	9
Les autres protéines de l'endocytose dans la mitose .....	9
L'apoptose .....	11
HIP1R dans l'apoptose .....	13
Les autres protéines de l'endocytose dans l'apoptose, et vice versa .....	13
1.3 Problématique et objectifs .....	14
Chapitre 2 .....	17
Matériel et méthodes .....	17
2.1 Clonage moléculaire .....	17
2.2 Culture cellulaire .....	18
2.3 Knock-down (KD).....	18
2.4 Quantification du KD .....	18
2.5 Transfection d'ADN.....	21
2.6 Immunofluorescence .....	21
2.7 Immunoprécipitation (IP) .....	22

2.8 Endocytose de la transferrine.....	22
2.9 Effet d'HIP1R sur la mitose .....	23
2.10 Analyse de la phosphorylation d'HIP1R durant la mitose .....	23
2.11 Isolation des mitochondries .....	23
2.12 Évaluation de l'activation de la caspase-9 et 3 par immunoblot .....	24
2.13 Évaluation de l'activation de la caspase-3 par fluorimétrie.....	24
2.14 Analyses statistiques.....	24
Chapitre 3 .....	25
Résultats .....	25
3.1 Clonage moléculaire .....	25
Colocalisation avec l'actine et la cortactine .....	26
Colocalisation avec l' $\alpha$ -tubuline.....	30
Immunoprécipitation de GFP-HIP1R.....	32
3.2 Knock-down d'HIP1R.....	33
3.3 Effet d'HIP1R sur le cytosquelette d'actine .....	34
3.4 Effet d'HIP1R sur l'endocytose de la transferrine.....	38
3.5 Effet d'HIP1R sur la mitose .....	39
3.6 Effet d'HIP1R sur l'apoptose .....	43
Chapitre 4 .....	49
Discussion.....	49
4.1 Clonage moléculaire.....	49
4.2 Effet d'HIP1R sur l'endocytose.....	52
4.3 Effet d'HIP1R sur la mitose .....	55
4.4 Effet d'HIP1R sur l'apoptose .....	57
Chapitre 5 .....	61
Conclusions et perspectives.....	61
Références .....	65
Annexe : Données brutes .....	71

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Constructions d'HIP1R à cloner .....	15
<b>Tableau 2 :</b> Liste des amorces utilisées pour le clonage .....	20
<b>Tableau 3 :</b> Résultats moyens des trois expériences de restauration du phénotype relié à l'actine .....	36
<b>Tableau 4 :</b> Résultats de la première expérience de restauration du phénotype relié à l'actine ...	37
<b>Tableau 5 :</b> Nombres de cellules HeLa comptées dans l'expérience 1 de KD-restauration et observation d'un cytosquelette d'actine normal ou anormal .....	71
<b>Tableau 6 :</b> Nombres de cellules HeLa comptées dans l'expérience 2 de KD-restauration et observation d'un cytosquelette d'actine normal ou anormal .....	72
<b>Tableau 7 :</b> Nombres de cellules HeLa comptées dans l'expérience 3 de KD-restauration et observation d'un cytosquelette d'actine normal ou anormal .....	73
<b>Tableau 8 :</b> Nombres de cellules HeLa comptées dans l'expérience 1 de KD-restauration et observation d'une endocytose de la transferrine normale, lente ou inexistante .....	74
<b>Tableau 9 :</b> Nombres de cellules HeLa comptées dans l'expérience 2 de KD-restauration et observation d'une endocytose de la transferrine normale, lente ou inexistante .....	74
<b>Tableau 10 :</b> Données brutes de l'expérience de l'effet d'HIP1R sur la progression de la mitose .....	75



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Structure d'HIP1R.....	2
<b>Figure 2</b> : Les cinq étapes de l'EMC.....	4
<b>Figure 3</b> : Les principales étapes de la mitose.....	6
<b>Figure 4</b> : Résumé du rôle endocytique ou non des protéines de l'endocytose.....	11
<b>Figure 5</b> : La voie extrinsèque de l'apoptose.....	12
<b>Figure 6</b> : Schématisation de la technique du mégaprimier.....	17
<b>Figure 7</b> : Technique de PCR utilisée pour le clonage de GFP-HIP1R $\Delta$ L.....	19
<b>Figure 8</b> : Colocalisation d'HIP1R avec l'actine et la cortactine.....	26
<b>Figure 9</b> : Colocalisation des structures d'HIP1R avec la clathrine.....	28
<b>Figure 10</b> : Colocalisation des structures d'HIP1R avec la cortactine.....	28
<b>Figure 11</b> : Colocalisation d'HIP1R avec l'actine et la cortactine.....	29
<b>Figure 12</b> : Colocalisation d'HIP1R lors de la mitose.....	31
<b>Figure 13</b> : Cellules en métaphase, transfectées avec différentes constructions d'HIP1R.....	32
<b>Figure 14</b> : Immunoprécipitation (IP) de GFP-HIP1R avec la clathrine.....	33
<b>Figure 15</b> : Effet des siRNA sur HIP1R.....	34
<b>Figure 16</b> : Phénotype recherché : organisation du cytosquelette d'actine.....	35
<b>Figure 17</b> : Le KD d'HIP1R provoque une désorganisation du cytosquelette d'actine.....	36
<b>Figure 18</b> : Phénotypes recherchés : endocytose.....	38
<b>Figure 19</b> : Immunoblot montrant le poids moléculaire d'HIP1R.....	40
<b>Figure 20</b> : Effet du KD d'HIP1R et de la réinsertion des mutants sur l'avancement de la mitose dans des cellules HeLa.....	41
<b>Figure 21</b> : Moyenne des pourcentages des cellules HeLa KD dans les différentes phases de la mitose.....	42
<b>Figure 22</b> : Présence d'HIP1R dans les mitochondries.....	44
<b>Figure 23</b> : Activation de la caspase-9.....	45
<b>Figure 24</b> : Activation de la caspase-3.....	46
<b>Figure 25</b> : Ponceau de l'immunoblot de la figure 24.....	75



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANTH : AP180 N-Terminal homology  
AP2 : adaptor protein 2  
Apaf-1 : apoptotic protease activating factor 1  
BAK : Bcl-2 homologous antagonist/killer  
BAX : Bcl-2 associated X-protein  
BH : Bcl-2 homology  
BSA : bovine serum albumin  
CALM : Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein  
CC : coiled coil  
Cdk : kinase dépendante des cyclines  
CHC : chaîne lourde de la clathrine  
CLC : chaîne légère de la clathrine  
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole  
DISC : Death inducing signaling complex  
DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium  
Drp1 : Dynamin-1-like protein  
Dyn : dynamine  
EGF : epidermal growth factor  
EMC : endocytose médiée par la clathrine  
Endp : endophiline  
Eps15 : EGFR pathway substrate 15  
FCHO : FCH only  
FL : full length  
GAK : cyclin-G associated kinase  
HIP1 : Huntingtin interacting protein 1  
HIP1R : Huntingtin interactin protein 1-related  
Hippi : HIP1 protein interactor  
HSC70 : Heat shock cognate 70  
IF : immunofluorescence  
IP : immunoprécipitation  
KD : knock-down  
LSB : Laemmli sample buffer  
N-WASP : Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein  
PCR : polymerase chain reaction  
pDED : pseudo death effector domain  
PFA : paraformaldéhyde  
PIP : Phosphatidylinositol phosphate  
PM : poids moléculaire  
PRD : domaine riche en proline  
SH3 : Src homolgy 3  
siRNA : small interfering RNA  
Sndp : syndapine  
SNX : sorting nexin  
THATCH : Talin-Hip1/R/Sla2p-Actin-Tethering C-Terminal homology



## REMERCIEMENTS

Je voudrais premièrement remercier toutes les personnes qui ont permis ce projet de recherche. Évidemment, ma directrice, Dre Valérie Legendre-Guillemin, pour sa supervision et ses encouragements, les membres du laboratoire Gépromic, et Dre Catherine Laprise pour leur soutien, le laboratoire du Dr Jean Legault pour leur coopération. Aussi, les équipes de l'IRCM pour leur accueil et leur aide : Dr Nabil Seidah, Dre Annik Prat, Dr Dominic Fillion, Xiaofeng Wang et Marie-Claude Asselin. Merci aussi aux évaluateurs pour leur temps et leurs commentaires : Dre Annie Angers et Dr Sébastien Carréno.

Un merci tout particulier à Jordi, Val, Anne-Marie, Lucie, Clément, Guillaume et Guillaume, pour le soutien, l'aide, les encouragements, les mille et un cafés et toutes ces choses qui m'ont donné la motivation et le plaisir d'aller jusqu'au bout de cette expérience.



# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 HUNTINGTIN INTERACTING PROTEIN 1-RELATED (HIP1R)

#### Mise en évidence de la protéine

HIP1R est une protéine ubiquitaire, se retrouvant principalement dans le cerveau, le pancréas, les reins et l'estomac (The Human Protein Atlas, site consulté en mai 2014). Son gène se situant sur le chromosome 12 en position q24.32, a une partie codante de 3204 paires de bases et sera traduit en une protéine de 1068 acides aminés (Chopra et al., 2000).

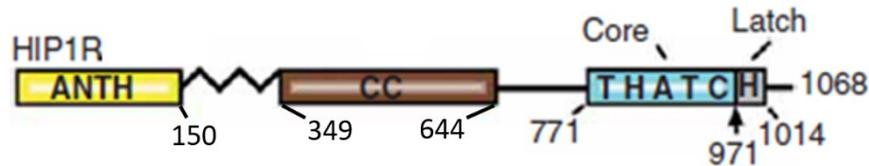
La protéine a été mise en évidence par l'équipe de Seki et al. en 1998 sur la base de son homologie de séquence avec la protéine Huntingtin interacting protein 1 (HIP1), protéine impliquée dans la maladie de Huntington par sa liaison à la protéine huntingtine (Kalchman et al., 1997). La protéine de Seki et al. (1998) était toutefois incomplète; c'est plutôt Chopra et al. (2000) qui ont mis en évidence la protéine complète. Malgré que HIP1 et HIP1R partagent à 66% la même séquence d'acide aminés, HIP1R ne contient pas le site de liaison à l'huntingtine, ce qui ne l'implique pas dans la physiopathologie de la maladie de Huntington (Chopra et al., 2000).

HIP1 et HIP1R peuvent former aussi bien des homodimères *in vivo* que des hétérodimères *in vitro* (Legendre-Guillemain et al., 2002), mais leur forme privilégiée reste l'homodimère (Wilbur et al., 2008). Ce résultat est logique puisque le pic d'expression d'HIP1 chez des souris est au 13<sup>e</sup> jour du stade embryonnaire, HIP1R n'étant qu'à peine détectable à ce moment, alors que le taux d'expression d'HIP1R augmente graduellement de la naissance jusqu'à l'âge adulte (Legendre-Guillemain et al., 2002).

#### Structure de la protéine

HIP1R est une protéine possédant plusieurs domaines fonctionnels (figure 1). Il y a trois domaines principaux : le domaine N-terminal ANTH (AP180 N-terminal Homology), le domaine central hélicoïdal (CC, pour «coiled coil») et le domaine C-terminal THATCH (Talin-HIP1/R/Sla2p-Actin-Tethering C-terminal Homology). Le domaine ANTH se termine avec le 150<sup>e</sup> acide aminé. C'est le domaine qui permet à HIP1R de se lier aux lipides membranaires, les phosphatidylinositol bi et triphosphates (PIP) (Ford et al., 2001). Il a la faculté de faire une liaison avec plusieurs types (PI(4,5)P<sub>2</sub>, PI(3,4,5)P<sub>3</sub>), mais les liaisons préférentielles sont faites avec les PI(3,4)P<sub>2</sub> et les PI(3,5)P<sub>2</sub> (Hyun et al., 2004b). Le domaine ANTH isolé de HIP1R peut

également, *in vitro*, se lier à la tubuline (Hussain et al., 2003), une protéine essentielle du processus mitotique (Alberts et al., 2008).



**Figure 1 : Structure d'HIP1R** (modifiée de Brett et al., 2006). Schématisation des trois domaines principaux de la protéine, avec les domaines ANTH, central hélicoïdal (CC) et THATCH. Ce dernier est composé d'un domaine THATCH, qui lui-même est composé d'un domaine Core et Latch. Les nombres correspondent aux acides aminés bordant les différents domaines.

Entre les domaines ANTH et central hélicoïdal, aux acides aminés 302-348, se trouve un site de liaison faible à la chaîne lourde de la clathrine (CHC) (Legendre-Guillemain et al., 2002). Cette liaison se fait par le domaine N-terminal de la CHC (Legendre-Guillemain et al., 2002; Metzler et al., 2001).

On retrouve au niveau du domaine central hélicoïdal le site de liaison d'HIP1R avec la chaîne légère de la clathrine (CLC) (Legendre-Guillemain et al., 2002), site dépendant des acides aminés <sup>463</sup>ELL de HIP1R (Legendre-Guillemain et al., 2005). Le domaine CC est aussi le site principal de dimérisation de la protéine, avec elle-même ou avec HIP1. Cette capacité de dimérisation est indépendante de sa liaison à la CLC (Legendre-Guillemain et al., 2005). De plus, il a été montré que HIP1R contient un motif «leucine zipper» dans ce domaine (acides aminés 507-535) (Engqvist-Goldstein et al., 1999; Seki et al., 1998) et que ces motifs sont impliqués dans la dimérisation et les interactions protéiques (John et al., 1994; Pearlman et al., 1994). Ce motif peut donc contribuer à ce que la liaison HIP1R-HIP1/HIP1R soit possible.

Le domaine THATCH est composé de deux autres domaines, soient Core (771-971) et Latch (972-1012) (Brett et al., 2006). Le domaine Core contient le site de liaison d'HIP1R à l'actine, aux acides aminés <sup>922</sup>KVK. Cette liaison n'est possible que lorsque HIP1R forme un homodimère, une conformation régulée par le domaine Latch (Brett et al., 2006). Il y a finalement un site de liaison à la cortactine, protéine impliquée dans l'organisation de l'actine, dans la région riche en l'acide aminé proline (PRD) dans la région C-terminale (1017-1068). Cette liaison se fait via le domaine SH3 (Src Homology 3) de la cortactine, et la liaison cortactine/HIP1R est plus forte lorsque le domaine ANTH est présent (Le Clainche et al., 2007).

## 1.2 MÉCANISMES CELLULAIRES DANS LESQUELS HIP1R EST IMPLIQUÉE

### L'endocytose médiée par la clathrine

Le mécanisme par lequel les cellules font l'internalisation du matériel extracellulaire se nomme endocytose (Alberts et al., 2008). Il y a différentes voies de l'endocytose qui ont été mises en évidence, mais celle qui implique HIP1R est celle médiée par la clathrine. Plusieurs fonctions essentielles sont régies par l'endocytose médiée par la clathrine (EMC), comme l'internalisation de nutriments, le remaniement des membranes ou la communication intercellulaire (Ramanan et al., 2011).

Ce type d'endocytose nécessite une invagination de la membrane plasmique, qui est recouverte d'un manteau de clathrine, du côté cytoplasmique. Ce manteau permet à la vésicule qui se détache de la membrane d'être acheminée vers les endosomes. Le contenu de la vésicule peut alors être recyclé vers la membrane plasmique ou dirigé vers les lysosomes pour être dégradé (Alberts et al., 2008).

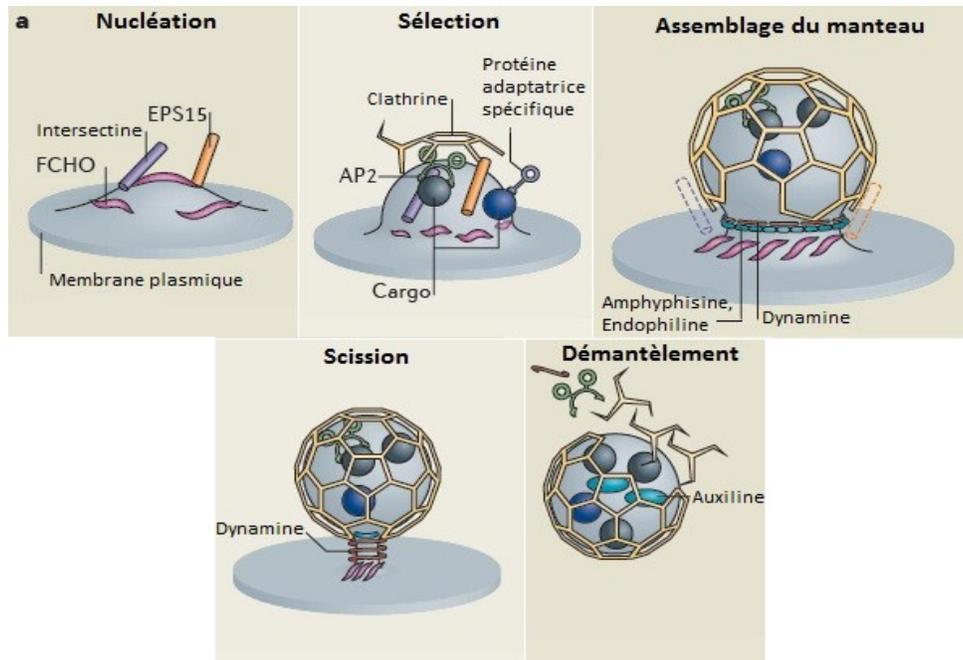
Le mécanisme de l'EMC peut être divisé en cinq grandes étapes : la nucléation, la sélection du cargo, l'assemblage du manteau de clathrine, la scission de la vésicule de transport puis le démantèlement de celle-ci (figure 2).

L'EMC est initiée par la formation aux sites endocytiques de modules de nucléation qui sont formés des protéines FCH domain only (FCHO), EGFR pathway substrate 15 (EPS15) et d'intersectines. Ces modules créent une courbure initiale dans la membrane plasmique, ce qui recrute la protéine adaptor protein 2 (AP2) (McMahon and Boucrot, 2011).

La molécule à être internalisée, ou cargo, se fixe à une protéine adaptatrice générale, comme AP2, ou à une protéine adaptatrice spécifique au cargo. C'est la protéine adaptatrice qui est fixée aux lipides membranaires, gardant ainsi le cargo à l'intérieur de la vésicule (McMahon and Boucrot, 2011).

L'étape qui suit est la formation du manteau de clathrine autour de la vésicule. Le constituant de ce manteau détermine la destination de la vésicule; la clathrine fait en sorte que la vésicule est destinée au transport entre la membrane plasmique et les endosomes ou le trans Golgi et les lysosomes (Alberts et al., 2008). La molécule de clathrine est constituée de trois chaînes lourdes (CHC) et de trois chaînes légères (CLC) qui s'assemblent en triskèles, structure tridimensionnelle qui contribue à accentuer la courbure dans la membrane (McPherson, 2010).

Les protéines adaptatrices permettent de recruter la clathrine aux vésicules et de la maintenir sur les lipides membranaires (McMahon and Boucrot, 2011).



**Figure 2: Les cinq étapes de l'EMC** (modifiée à partir de McMahon et Boucrot, 2011). Illustration du mécanisme global de l'EMC. Le mécanisme débute avec la nucléation de la membrane plasmique à l'aide des protéines FCHO, intersectine et EPS15. Il y a ensuite sélection de la molécule à transporter par AP2. Celle-ci recrute aussi les molécules de clathrine, qui s'assemblent en cage pour former le manteau de la vésicule. Il y a également resserrement de la vésicule par des protéines telles que l'amphiphysine et l'endophiline, pour que la dynamine puisse procéder à la scission de la vésicule. Finalement, le démantèlement de la vésicule est provoqué par des protéines telles l'auxiline.

Alors que la courbure de la membrane continue de s'accroître, grâce aux protéines endophiline et amphiphysine, la vésicule doit éventuellement être séparée de la membrane pour pouvoir migrer à l'intérieur de la cellule. La dynamine est à son tour recrutée aux sites endocytiques. Elle forme un anneau de constriction sur le cou de la vésicule, ce qui modifie la membrane et libère la vésicule (McMahon and Boucrot, 2011; Rao et al., 2012).

La dernière étape de l'EMC est le démantèlement de la vésicule. Les triskèles de clathrine changent de conformation via l'action de la synaptojanine, une phosphatase de lipides qui altère les lipides membranaires. Elle recrute la cyclin G-associated kinase (GAK) (ou auxiline, suivant le tissu) et celle-ci recrute à son tour heat shock cognate 70 (HSC70). L'ensemble assure que les

triskèles changent de conformation, détachant ainsi les molécules de clathrine des vésicules. (McMahon and Boucrot, 2011).

### ***HIP1R dans l'EMC***

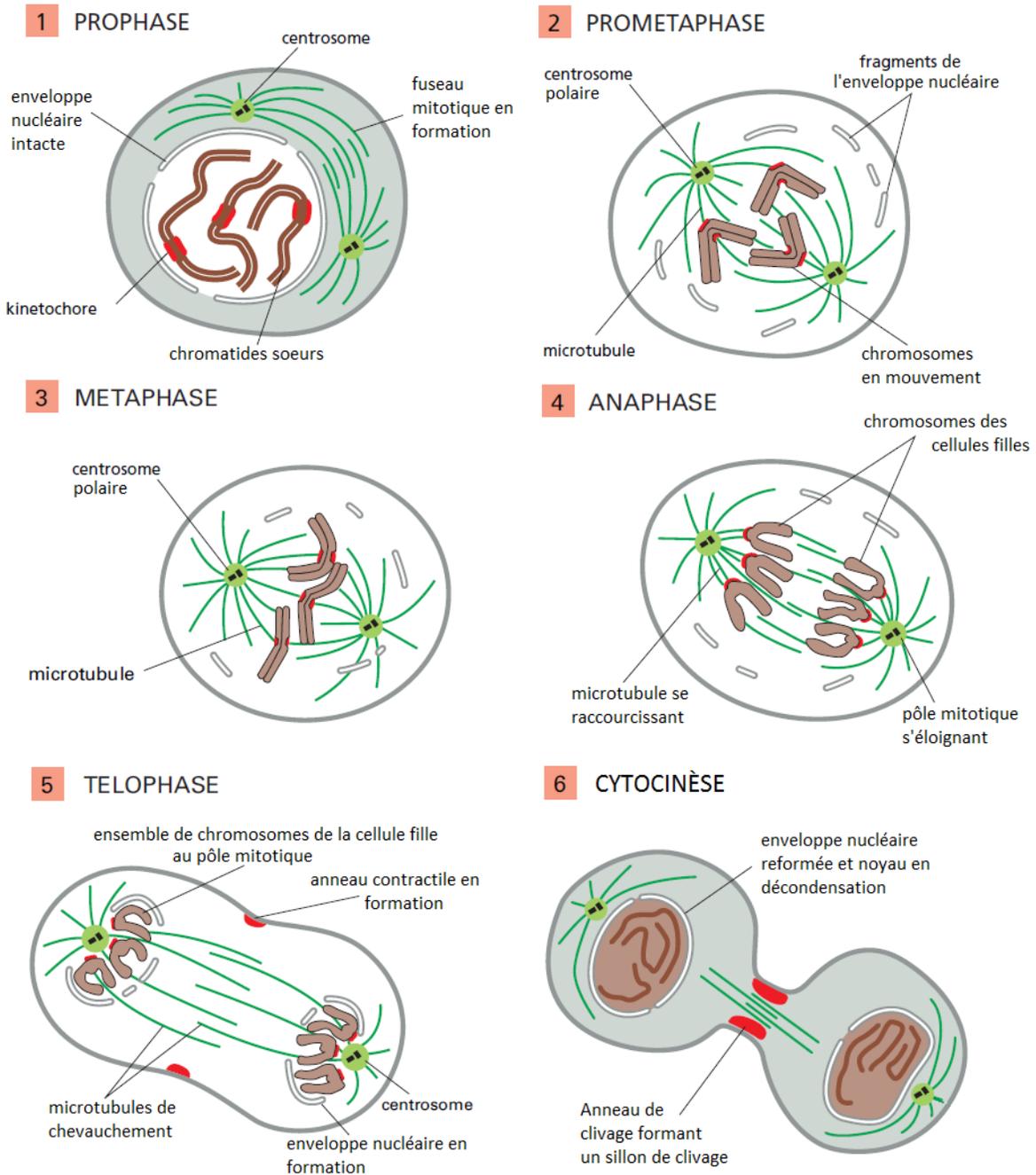
Au tout début du processus de l'EMC, HIP1R est recrutée aux sites endocytiques où elle participe à induire l'assemblage des triskèles de clathrine (Engqvist-Goldstein et al., 2001). Ensuite, HIP1R peut faire le lien entre les vésicules endocytiques et le cytosquelette d'actine pour permettre à celles-ci de migrer dans la cellule, étant donné la capacité de HIP1R de lier les lipides membranaires, la clathrine et l'actine (Engqvist-Goldstein et al., 1999; Hyun et al., 2004b; Le Clainche et al., 2007; Legendre-Guillemain et al., 2002). On sait d'ailleurs que la polymérisation de l'actine-F (filamenteuse) se produit en partant de la membrane plasmique vers les endosomes, au moment où les vésicules endocytiques commencent à se former (Merrifield et al., 2002). Cette polymérisation est dirigée par certaines protéines, telles que le complexe Arp2/3, la neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) et la cortactine (Engqvist-Goldstein et al., 2004; Merrifield et al., 2004). La polymérisation de l'actine peut être un des moyens qui permet aux vésicules de migrer dans la cellule, via leur liaison avec des protéines intermédiaires comme HIP1R (Le Clainche et al., 2007). On sait aussi que HIP1R participe à ce que la polymérisation de l'actine aux sites endocytiques se fasse correctement, par sa liaison avec la clathrine ou les lipides membranaires et la cortactine (Wilbur et al., 2008).

### **La mitose**

Lorsque la cellule est dans un contexte favorable de croissance, elle double son matériel génétique pour éventuellement entrer en phase M (pour mitose) et diviser cet ADN équitablement. Il en résulte deux cellules identiques (Alberts et al., 2008). Ce processus peut être divisé en six étapes distinctes (voir figure 3).

#### ***Les étapes principales de la mitose***

La première étape est la *prophase*. Pendant cette étape, la chromatine se condense en chromatides qui seront associées de façon à ce que chaque chromatide sœur soit ensemble, reliée par le centromère, via les kinétochores (regroupement de protéines mitotiques). La cohésine aide à maintenir les chromatides ensemble. Aussi, les fuseaux mitotiques formés de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  commencent à se former à partir des centrosomes qui s'éloignent l'un de l'autre (Alberts et al., 2008).



**Figure 3: Les principales étapes de la mitose** (modifiée à partir de Alberts et al., 2008). 1- Prophase: l'ADN se condense et les centrosomes migrent vers les pôles. 2- Prométaphase: l'enveloppe nucléaire se rompt et les fuseaux mitotiques se joignent aux chromosomes. 3- Métaphase: les chromosomes s'alignent au centre de la cellule. 4- Anaphase: les chromosomes sont séparés. 5- Télaphase: l'enveloppe nucléaire se reforme et le clivage commence entre les cellules filles. 6- Cytocinèse: l'ADN se décondense et la séparation entre les cellules se complète.

La seconde étape est la *prométaphase*. À ce moment, l'enveloppe nucléaire se défait, laissant les chromosomes libres dans la cellule. Les centrosomes sont positionnés aux pôles cellulaires grâce aux microtubules astraux. Des centrosomes partent également des microtubules qui deviendront des microtubules de chevauchement ou de kinétochore. Ces derniers iront s'attacher aux kinétochores de chaque chromosome, mettant ceux-ci en mouvement par l'action de polymérisation ou de dépolymérisation des microtubules (Alberts et al., 2008).

La troisième étape, la *métaphase*, est caractérisée par l'alignement sur la plaque équatoriale des chromosomes. Ils sont également attachés à chacun des pôles par les microtubules (Alberts et al., 2008).

Lors de la quatrième étape, l'*anaphase*, l'ADN doublé est séparé et amené à chacun des pôles. La force motrice permettant cette action est la dépolymérisation des microtubules associés aux kinétochores. Aussi, la séparation des chromatides sœurs est aidée par le clivage de la cohésine. Finalement, les microtubules de chevauchement opposés se rejoignent, se lient les uns aux autres et continuent leur polymérisation, éloignant les deux futures cellules l'une de l'autre (Alberts et al., 2008).

La cinquième étape est la *télophase*. Elle se caractérise par la perte des fuseaux mitotiques et la reformation de l'enveloppe nucléaire. Cette enveloppe commence à se former graduellement autour de chaque chromosome et fusionne peu à peu. La polymérisation des microtubules de chevauchement a tellement séparé les deux nouveaux ensembles de chromosomes qu'un anneau contractile composé de myosine et d'actine commence à former un sillon dans la membrane plasmique (Alberts et al., 2008).

Finalement, la dernière étape est la *cytocinèse*. Le cytoplasme est séparé en deux par l'anneau contractile pour former deux cellules distinctes et l'ADN se décondense sous forme de chromatine (Alberts et al., 2008).

### ***Le contrôle de la mitose***

Étant donné que la mitose est une étape si importante dans le cycle de la cellule, plusieurs mécanismes s'assurent que tous les éléments soient favorables et optimaux avant de compléter le cycle. Le but étant évidemment que les deux cellules filles soient identiques et que l'intégrité génétique soit gardée.

Une des composantes majeures dans ce contrôle sont les kinases dépendantes des cyclines (cdk). Elles amènent une phosphorylation cyclique de certaines protéines, ce qui les active ou leur donne un nouveau rôle. Les cyclines sont des protéines dont la concentration varie beaucoup lors du cycle cellulaire et qui ont pour but principal d'activer les cdk. Il y a différentes cyclines et cdk, mais ce sont surtout les S-cyclines et les M-cyclines qui contrôlent les événements de la mitose, aussi bien par leur présence que par leur absence (Alberts et al., 2008).

### ***L'endocytose durant la mitose***

Deux courants de pensée s'affrontent pour déterminer si l'endocytose médiée par la clathrine persiste ou non durant la mitose. D'un côté, on montre que l'internalisation de vésicules se produit toujours durant la mitose, mais que c'est le retour à la membrane de ces vésicules qui est stoppé (Boucrot and Kirchhausen, 2007). Aussi, on suggère que les expériences faites avec des cellules synchronisées en mitose ne reflètent pas la réalité puisque ces techniques induiraient un arrêt de l'endocytose (Tacheva-Grigorova et al., 2013).

De l'autre côté, on affirme plutôt que lors de la mitose, l'endocytose médiée par la clathrine est arrêtée (Fielding and Royle, 2013). Elle cesse rapidement lors de la prophase et est réinitialisée lors de l'anaphase (Fielding et al., 2012). Les raisons pour lesquelles il y a un arrêt ne sont pas encore claires, mais de plus en plus d'indices pointent vers le fait que le rôle de plusieurs protéines de l'endocytose serait détourné pendant la mitose. En effet, un bon nombre de ces protéines voient leur rôle changer durant certaines phases de la mitose (Royle, 2013).

Un des mécanismes expliquant que ces protéines normalement impliquées dans l'endocytose médiée par la clathrine changent de rôle, pourrait être parce qu'elles se font phosphoryler par les cdk mitotiques (Fielding and Royle, 2013). Il existe quelques exemples pour supporter cette théorie: amphiphysine se fait phosphoryler par cdk5 et cdk1 (Floyd et al., 2001) et Eps15 et epsine perdent la faculté de se lier avec AP2 lorsqu'elles sont phosphorylées par cdk1 (Chen et al., 1999). Étant donné que la fonction d'une protéine est très souvent dictée par sa structure, le fait qu'elle subisse un changement post-traductionnel (la phosphorylation) pourrait expliquer qu'elle change d'une fonction endocytique à mitotique, à plus forte raison si la kinase responsable de cette phosphorylation n'est présente que lors de la mitose.

Un autre facteur expliquant l'arrêt de l'EMC est l'indisponibilité du cytosquelette d'actine durant la mitose (Kaur et al., 2014). Lors de la mitose, la tension membranaire augmente et l'actine participe à garder la forme ronde de la cellule (Stewart et al., 2011). L'actine est donc indisponible pour participer à l'EMC durant la mitose. En effet, étant donné que lorsqu'on lui

permet d'être à nouveau disponible à l'EMC lors de la phase mitotique en inhibant l'expression de Ect2, nécessaire à la formation d'un cortex d'actine rigide durant la mitose (Matthews et al., 2012), ou en activant Rap1 normalement inactivé durant la mitose pour permettre à la cellule d'être ronde (Dao et al., 2009), l'EMC persiste (Kaur et al., 2014).

### ***HIP1R dans la mitose***

HIP1R a été impliquée dans la mitose dans un article publié en 2010. On y montre, dans des cellules HeLa, une très bonne colocalisation de la protéine avec l' $\alpha$ -tubuline lors de la métaphase, impliquant qu'HIP1R fait partie des fuseaux mitotiques, ce qui a été renforcé par la présence d'HIP1R dans une isolation de fuseaux mitotiques (Park, 2010). Aussi, l'auteur a procédé à une inhibition de l'expression endogène de HIP1R pour remarquer qu'il en résultait un mauvais alignement des chromosomes, toujours lors de la métaphase, et que ceci était probablement dû au fait que les microtubules étaient mal attachés aux kinétochores. Aucun domaine d'HIP1R n'a été mis en cause dans cet article, cependant il a été montré que le domaine ANTH d'HIP1R pouvait se lier à la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ III (Hussain et al., 2003). Il est donc très possible que si HIP1R a un rôle dans la mitose, ce soit grâce à ce domaine.

Il faut maintenant se demander ce qui fait en sorte que HIP1R change de fonctions. Pourquoi a-t-elle un rôle endocytique aussi bien qu'un rôle mitotique? Il est légitime de se demander si elle aussi est phosphorylée par une cdk. Justement, HIP1R fait partie de la liste des quelques 3000 protéines phosphorylées durant la mitose (Dephoure et al., 2008). La position de cette modification est sur la sérine en position 1017. Aussi, selon l'outil PhosphoSitePlus (consulté en mai 2014), cette région de HIP1R correspond assez bien à la séquence des substrats de cdk1. C'est également une région qui est bien conservée chez les mammifères, signe que cette région pourrait être fonctionnelle. Il est donc plausible que HIP1R se fasse phosphoryler par une cdk durant la mitose, et que cette modification soit la cause de son changement de fonction.

### ***Les autres protéines de l'endocytose dans la mitose***

HIP1R n'est pas la seule protéine de l'endocytose à avoir un rôle dans un autre mécanisme. Plusieurs études ont mis en évidence que des protéines que l'on croyait avoir un rôle exclusivement endocytique étaient des acteurs clés de la mitose, et ce, à différents stades.

Par exemple, la  $\beta$ -adaptine, une des sous-unités d'AP2, protéine adaptatrice qui fait le lien entre les molécules à être internalisées et les vésicules de clathrine, a la capacité de se lier avec les kinases Bub1 et BubR1 (Cayrol et al., 2002). Ces kinases sont impliquées dans la progression de la mitose : elles veillent notamment à ce que les chromosomes soient bien séparés lors de

l'anaphase (Taylor et al., 1998). Il est donc possible que grâce à cette liaison, la  $\beta$ -adaptine joue un rôle dans le passage à la télophase.

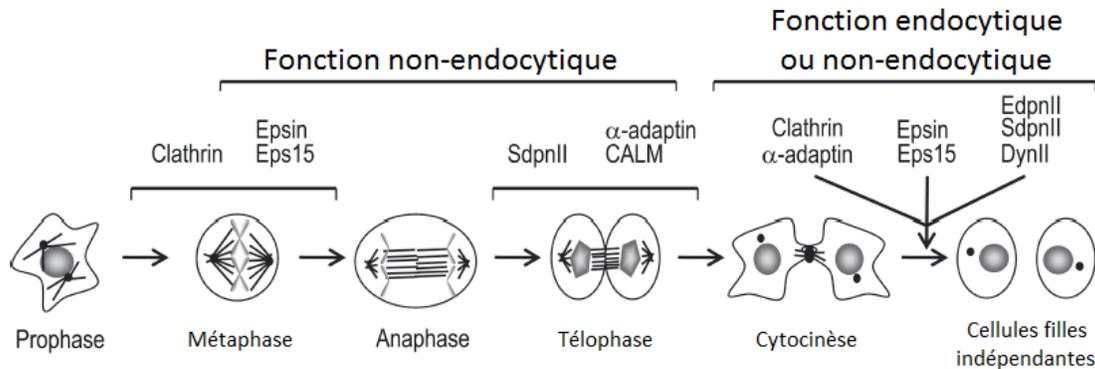
Aussi, la dynamine, qui permet la scission de la vésicule de la membrane plasmique lors de l'endocytose, possède un domaine riche en proline qui lui permet de se lier à la tubuline (Ishida et al., 2011) et de renforcer les microtubules lors de la mitose (Smith and Chircop, 2012; Thompson et al., 2002).

Une des protéines principales de l'EMC, la clathrine, a été très étudiée pour son rôle majeur dans la mitose. Elle joue un rôle dans l'alignement des chromosomes (Royle, 2005). Par sa structure en triskèle, la clathrine forme des ponts entre les microtubules dans le but de les stabiliser (Royle and Lagnado, 2006). Deux des jambes d'une molécule de clathrine se fixent sur un microtubule et la troisième jambe se fixe sur le microtubule voisin (Booth et al., 2011). La clathrine est recrutée, entre autre, par SNX9 (sorting nexin 9) (Ma et al., 2013), une protéine adaptatrice de l'endocytose. La clathrine a également un rôle dans la maturation des centrosomes dans la phase G<sub>2</sub>/M (Foraker et al., 2012).

Plusieurs autres protéines de l'EMC ont également un rôle mitotique, que ce soit pendant la prophase pour assurer l'intégrité des centrosomes ou des microtubules (Grimm-Günter et al., 2008; Lehtonen et al., 2008; Shimizu et al., 2009), pendant la métaphase, pour vérifier que les microtubules sont bien attachés aux chromosomes (Liu and Zheng, 2009; Park, 2010), ou pendant la cytokinèse, pour réguler la division des cellules filles (Chircop et al., 2011; Smith and Chircop, 2012).

Finalement, une équipe a procédé au KD de plusieurs protéines de l'endocytose dans le but de déterminer si elles avaient un autre rôle lors de la mitose. Les protéines testées sont SNX9, SNX18, SNX33 (Ma and Chircop, 2012), dynamine 2,  $\alpha$ -adaptine, CALM (Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein), CHC, epsine, Eps15, endophiline et syndapine (Smith and Chircop, 2012). Par exemple, Eps15 aide à la ségrégation des chromosomes et epsine, qui facilite la formation des vésicules endocytiques, joue entre autre un rôle dans la progression de la mitose à un rythme normal (Smith and Chircop, 2012). Toutes ont un rôle mitotique, mais étant donné qu'aucune expérience de restauration de phénotype n'a été faite, on ne peut pas affirmer hors de tout doute que les phénotypes observés ne sont pas dus à la technique de knock-down. Aussi, étant donné que l'endocytose reprend pendant l'anaphase (Fielding et al., 2012), le fait que certaines protéines de l'EMC semblent jouer un rôle dans les étapes subséquentes est peut-être

simplement dû au rôle endocytaire de la protéine en question (figure 4), d'autant plus que l'EMC est requise lors de la cytokinèse (Ma and Chircop, 2012; Smith and Chircop, 2012).



**Figure 4 : Résumé du rôle endocytaire ou non des protéines de l'endocytose** (modifiée de Smith et Chircop, 2012). Certaines protéines ont des rôles non-endocytaires clairs (clathrine, epsine, Eps15, syndapine (SdpnII), l' $\alpha$ -adaptine et CALM). Ces rôles prennent place dans les quatre premières phases de la mitose. Parmi celles-ci, la clathrine, l' $\alpha$ -adaptine, epsine, Eps15, syndapine, mais aussi endophiline (EdpnII) et dynamine (DynII) pourraient avoir un rôle dans la mitose qui soit aussi bien endocytaire que non-endocytaire. Ces rôles prennent place pendant la formation du pont intercellulaire et la scission de la membrane des deux cellules filles.

## L'apoptose

L'apoptose est la mort cellulaire programmée, c'est-à-dire qu'après un certain nombre de divisions ou lorsque la cellule présente trop d'anomalies génétiques, sa structure va s'effondrer sur elle-même et se désintégrer de façon contrôlée. Les débris seront rapidement phagocytés par les cellules du système immunitaire (Alberts et al., 2008). Étant donné que ce mécanisme est si important pour maintenir l'intégrité d'un organisme, il y a plusieurs façons d'initier l'apoptose, mais tous ces moyens finissent par une cascade protéique entraînant l'activation d'une classe de protéases appelées caspases. Le rôle des caspases est de procéder au clivage systématique des protéines cytosoliques et de la lamine, protéine constituant la membrane nucléaire (Alberts et al., 2008). Il y a deux mécanismes amenant à l'apoptose, soient une voie intrinsèque et une voie extrinsèque (figure 5). La voie extrinsèque est surtout empruntée par certaines cellules du système immunitaire pour éliminer les cellules qui ne présentent pas d'antigènes du soi (Alberts et al., 2008). Lorsque les ligands Fas présents à la surface de ces cellules se lient aux récepteurs des cellules cibles, les caspases sont clivées de leur pro-domaine et deviennent actives, entraînant la mort cellulaire (Alberts et al., 2008).

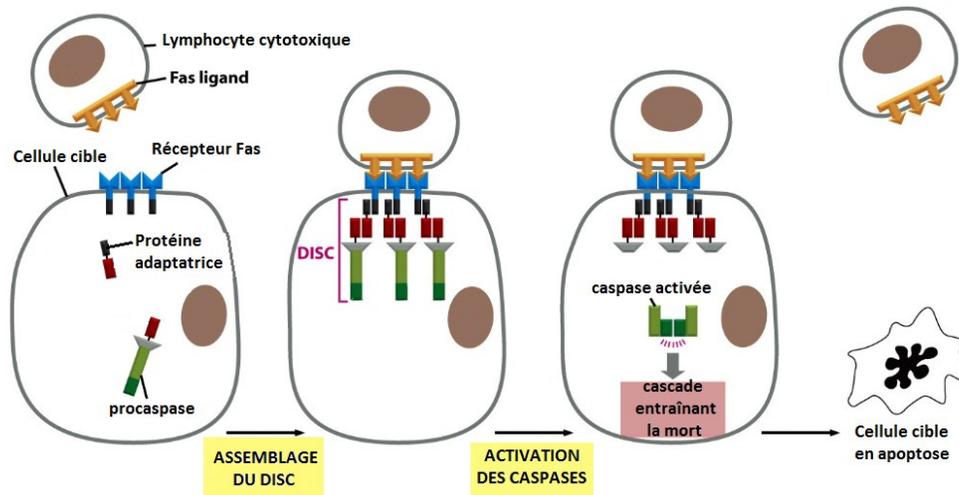


Figure 18-6 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

**Figure 5 : La voie extrinsèque de l'apoptose** (modifiée de Alberts et al., 2008): Lorsqu'un lymphocyte cytotoxique reconnaît une cellule à détruire, son ligand Fas se lie au récepteur Fas de la cellule cible. Ceci va permettre l'assemblage d'un complexe protéique appelé DISC (death-inducing signaling complex) dans lequel est la caspase inactive (procaspase). De cette façon, la caspase sera activée et induira l'apoptose.

La voie intrinsèque de l'apoptose implique l'intégrité structurale de la mitochondrie : quand ses protéines intermembranaires sont libres dans le cytosol, la cascade protéique entraînant l'activation des caspases est initiée et l'apoptose a lieu. Ce mécanisme est hautement régulé par les protéines de la famille Bcl-2 (Alberts et al., 2008).

Cette famille est divisée en trois classes : 1) les protéines anti-apoptiques possédant les quatre domaines BH (Bcl-2 homology), soient BH1, BH2, BH3 et BH4 qui ont un rôle répresseur de la deuxième classe, 2) les protéines pro-apoptiques qui présentent les domaines BH1, BH2 et BH3, leur rôle principal étant de former des pores dans la membrane externe des mitochondries, laissant ainsi s'échapper les protéines intermembranaires, et 3) les protéines pro-apoptiques ne présentant que le domaine BH3. Le rôle des protéines de cette dernière classe est d'inhiber le rôle de la première classe, ou d'activer les membres de la deuxième (Alberts et al., 2008). On dénombre pour l'instant six membres dans la première classe, dont Bcl-2 et Bcl-B, deux membres dans la deuxième, soient BAX (Bcl-2-associated X protein) et BAK (Bcl-2 homologous antagonist/killer), et un nombre croissant de membres de la troisième catégorie, dont HIP1R (Hawley et al., 2012; Westphal et al., 2011). Lorsque des pores sont formés dans la membrane externe des mitochondries, le cytochrome c est libéré dans le cytosol. Il s'associe avec Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) et la procaspase-9 et forme un complexe nommé

apoptosome. Ceci clive le pro-domaine de la caspase-9, qui par la suite active les caspases «bourreaux» (eg caspase-3) et conduit à l'élimination de la cellule (Alberts et al., 2008).

### ***HIP1R dans l'apoptose***

C'est dans un dépistage assez récent qu'HIP1R a été inclus dans la classe des protéines BH3-only (3<sup>e</sup> classe); une base de donnée de séquences codantes (NCBI Consensus Coding Sequence database) a été analysée en cherchant le motif consensus des domaines BH3, et HIP1R est ressorti (Hawley et al., 2012). Ceci est venu confirmer les résultats obtenus par une autre équipe qui a impliqué pour la première fois HIP1R dans l'apoptose (Kim et al., 2009). Les auteurs ont trouvé qu'HIP1R, via une interaction avec la protéine anti-apoptotique Bcl-B, entraîne une augmentation de l'activation de la caspase-9 et 3, induisant ainsi l'apoptose. Il a été montré qu'en temps normal, Bcl-B empêche l'apoptose grâce à sa liaison à la membrane externe de la mitochondrie par son domaine C-terminal transmembranaire (Ke et al., 2001), et la présence de son domaine BH4 (Zhang et al., 2001). Aussi, il est reconnu que généralement, le mode d'action des membres de la première classe de la famille Bcl-2 est d'emprisonner le domaine BH3 effecteur de BAK ou BAX (Westphal et al., 2011), ce qui est probablement le mode d'action de Bcl-B. Donc, HIP1R a la capacité de se lier à Bcl-B avec ses domaines ANTH et THATCH, ce qui entraîne une augmentation de l'apoptose (Kim et al., 2009). Le domaine BH3 attribué à HIP1R par Hawley et ses collaborateurs (2012) se trouve justement dans le domaine THATCH. Il faut donc qu'avec ces deux domaines, HIP1R séquestre d'une certaine manière Bcl-B pour l'empêcher d'agir sur BAK ou BAX.

Aussi, Bcl-B se lie à la caspase-9 dans un système de surexpression, et l'ajout d'HIP1R dans ce système augmente la liaison Bcl-B/caspase-9 (Kim et al., 2009). Il est connu que Boo/Diva, l'homologue murin de Bcl-B, forme un complexe tertiaire avec Apaf-1 et la procaspase-9 (Song et al., 1999) et que HIP1, la protéine présentant une homologie de séquence avec HIP1R, peut également se lier avec Apaf-1 et activer la caspase-9 (Choi et al., 2006). Il est donc intéressant que HIP1R influence la liaison entre Bcl-B et la caspase-9 dans un modèle cellulaire HEK293T, sans qu'HIP1R ne prenne une place directe dans l'interaction (Kim et al., 2009).

### ***Les autres protéines de l'endocytose dans l'apoptose, et vice versa***

D'autres liens entre l'EMC et l'apoptose peuvent être faits. Par exemple, HIP1 est toxique lorsque libre dans la cellule comme dans le contexte de la maladie de Huntington, (Hackam et al., 2000; Kalchman et al., 1997). Ceci est dû à un domaine pseudo-death effector (pDED) (Gervais et al., 2002). Aussi, avec un de ses partenaires d'interaction, HIPPI (HIP-1

protein interactor), HIP1 a un rôle dans la transcription des caspases-1, -8 et -10 . Le signal de localisation nucléaire d'HIP1 permet au domaine pDED d'HIPPI de se fixer au site de transcription de ces gènes (Banerjee et al., 2010).

Dans le sens inverse, Bcl-X<sub>L</sub>, une protéine anti-apoptotique largement exprimée dans le cerveau adulte (Krajewska et al., 2002), a un rôle dans l'endocytose grâce à une liaison avec la protéine Drp1 (Dynamin-1-like protein). Suite à l'activation de Bcl-X<sub>L</sub> par la calmoduline, Drp1 participe à la régulation de la morphologie des vésicules de clathrine dans les neurones de l'hippocampe. Le complexe Bcl-X<sub>L</sub>/Drp1 est alors nécessaire pour que l'endocytose médiée par la clathrine se fasse à un rythme normal (Li et al., 2013).

### 1.3 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

HIP1R joue donc un rôle central dans plusieurs processus cellulaires importants. Elle participe à l'assemblage des triskèles de clathrine (Engqvist-Goldstein et al., 2001), possède la capacité de se lier aussi bien à la CLC qu'à l'actine (Engqvist-Goldstein et al., 1999; Le Clainche et al., 2007; Legendre-Guillemain et al., 2002), stabilise la polymérisation de l'actine (Wilbur et al., 2008), aide à la ségrégation des chromosomes lors de la mitose (Park, 2010), et participe à un des mécanismes de la voie intrinsèque de l'apoptose (Kim et al., 2009). La problématique vient principalement du fait que certains de ces rôles sont mutuellement exclusifs. Par exemple, HIP1R ne peut pas directement faire le lien entre l'actine et la clathrine (Wilbur et al., 2008). Son rôle dans l'endocytose n'est pas non plus possible en même temps que celui dans la mitose, étant donné l'arrêt de l'endocytose durant la mitose (Fielding and Royle, 2013), et bien évidemment, si HIP1R agit dans le but d'enclencher l'apoptose, ce sera très probablement son seul but. On ne sait donc pas exactement ce qui lui permet de passer d'un rôle à l'autre, ni la séquence exacte de son action. De plus, son implication dans la mitose et dans l'apoptose sont des découvertes assez récentes qui offrent peu de réponses aux questions engendrées. Le but de ce projet est donc de mieux comprendre la dynamique cellulaire d'HIP1R en empêchant l'expression endogène de la protéine et en la remplaçant par des mutants ayant des mutations ou des délétions empêchant sa liaison avec des partenaires clés.

Les objectifs secondaires de l'étude sont les suivants:

1- produire par clonage moléculaire des constructions de HIP1R permettant d'étudier la fonction des liaisons avec les partenaires de la protéine;

2- inhiber l'expression endogène de HIP1R dans un modèle cellulaire par knock-down;

3- transfecter de façon transitoire l'ADN de la protéine normale ou modifiée dans ce même modèle cellulaire et étudier le phénotype résultant.

Les constructions permettront toutes de mieux définir les interactions possibles, et donc les fonctions possibles de HIP1R. Au total, cinq constructions seront clonées. Ces constructions sont décrites dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Constructions d'HIP1R à cloner.** Liste des mutants d'HIP1R, les interactions qu'ils devraient empêcher et les mécanismes qui devraient être affectés par ces interactions empêchées.

<b>Constructions</b>	<b>Liaisons potentiellement empêchées</b>	<b>Mécanismes potentiellement affectés</b>
<b>GFP-HIP1R ΔANTH (ΔA) (149-1068)</b>	Phospholipides membranaires <sup>1</sup>	Endocytose
	Tubuline <sup>2</sup>	Mitose
<b>GFP-HIP1R ΔANTHΔTHATCH (ΔAT) (149-771)</b>	Tubuline <sup>2</sup>	Mitose
	Phospholipides membranaires <sup>1</sup>	Endocytose
	HIP1R <sup>3</sup>	Endocytose
	Actine <sup>4</sup>	Endocytose
	Cortactine <sup>5</sup>	Endocytose
<b>GFP-HIP1R ΔLatch (ΔL) (Δ972-1014)</b>	Bcl-B <sup>6</sup>	Apoptose
	HIP1R <sup>3</sup>	Endocytose
<b>GFP-HIP1R<sup>463</sup>ELL/AAA</b>	Actine <sup>4</sup>	Endocytose
	Clathrine <sup>7</sup>	Mitose
<b>GFP-HIP1R<sup>922</sup>KVK/DDD</b>	Actine <sup>4</sup>	Endocytose

<sup>1</sup> Hyun et al., 2004b

<sup>2</sup> Hussain et al., 2003

<sup>3</sup> Legendre-Guillemain et al., 2005

<sup>4</sup> Brett et al., 2006

<sup>5</sup> Le Clainche et al., 2007

<sup>6</sup> Kim et al., 2009

<sup>7</sup> Legendre-Guillemain et al., 2002

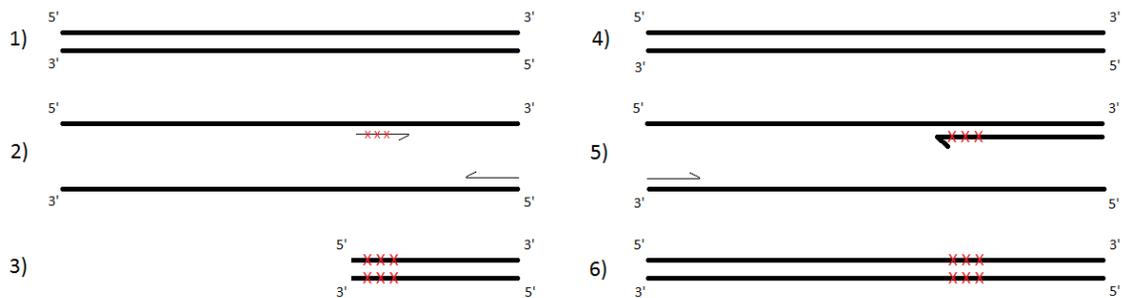


## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 CLONAGE MOLÉCULAIRE

Une mutation silencieuse a été introduite dans l'ADN matrice d'HIP1R pour rendre l'ARN messager insensible aux siRNA (voir section 2.3). Ce nouvel ADN a ensuite été cloné dans le vecteur pEGFP-C2 (BD Biosciences) au niveau des sites EcoRI et XhoI puis introduit dans des bactéries compétentes DH5 $\alpha$  (NEB). Il a été produit par la technique du mégaprimé (figure 6). Brièvement, une première PCR (polymerase chain reaction) a servi à incorporer les mutations en question (tableau 2 pour la séquence des amorces utilisées). Ensuite, ce produit de PCR a servi d'amorce pour une deuxième PCR, amplifiant ainsi l'ADN de la protéine complète.



**Figure 6 : Schématisation de la technique du mégaprimé.** 1) L'ADN matrice utilisé est celui d'HIP1R. 2) Une première PCR est effectuée avec une amorce anti-sens dans laquelle est incluse la mutation silencieuse («xx» rouges), et une amorce sens se fixant à la partie 5' du brin complémentaire. 3) Le produit PCR obtenu est un fragment de l'ADN d'HIP1R qui contient la mutation silencieuse et qui sera utilisé comme amorce pour la seconde PCR (mégaprimé). 4) L'ADN matrice pour la seconde PCR est toujours celui d'HIP1R. 5) Une amorce sens qui se fixe à la partie 5' du brin matrice est utilisée pour la seconde PCR, ainsi que le mégaprimé. 6) L'amplification avec le mégaprimé résulte en l'ADN d'HIP1R contenant la mutation silencieuse.

L'ADN de GFP-HIP1R ainsi cloné a servi de matrice pour les clonages subséquents: GFP-HIP1R  $\Delta A$  (149-1068), GFP-HIP1R  $\Delta AT$  (149-770), GFP-HIP1R  $\Delta L$  ( $\Delta 972-1014$ ), GFP-HIP1R <sup>922</sup>KVK/DDD et GFP-HIP1R <sup>463</sup>ELL/AAA. Parmi ceux-ci, deux ADN ont été clonés avec la technique du mégaprimé (KVK/DDD et ELL/AAA) et un a été cloné par trois PCR successives ( $\Delta L$ ); deux premières PCR servant à obtenir les délétions du domaine et une troisième ayant ces PCR pour matrice (figure 7). Toutes les constructions ont également été insérées dans le

vecteur pEGFP-C2 aux sites EcoRI et XhoI, puis introduites dans les bactéries compétentes DH5 $\alpha$  (NEB).

## **2.2 CULTURE CELLULAIRE**

Les cellules utilisées sont les lignées HeLa et HEK293T et les passages ont été effectués deux fois par semaine, à intervalles réguliers. Le milieu de culture est le Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) avec 10% de sérum de veau fœtal, 0,1 mg/ml de streptomycine et 100 UI/ml de pénicilline.

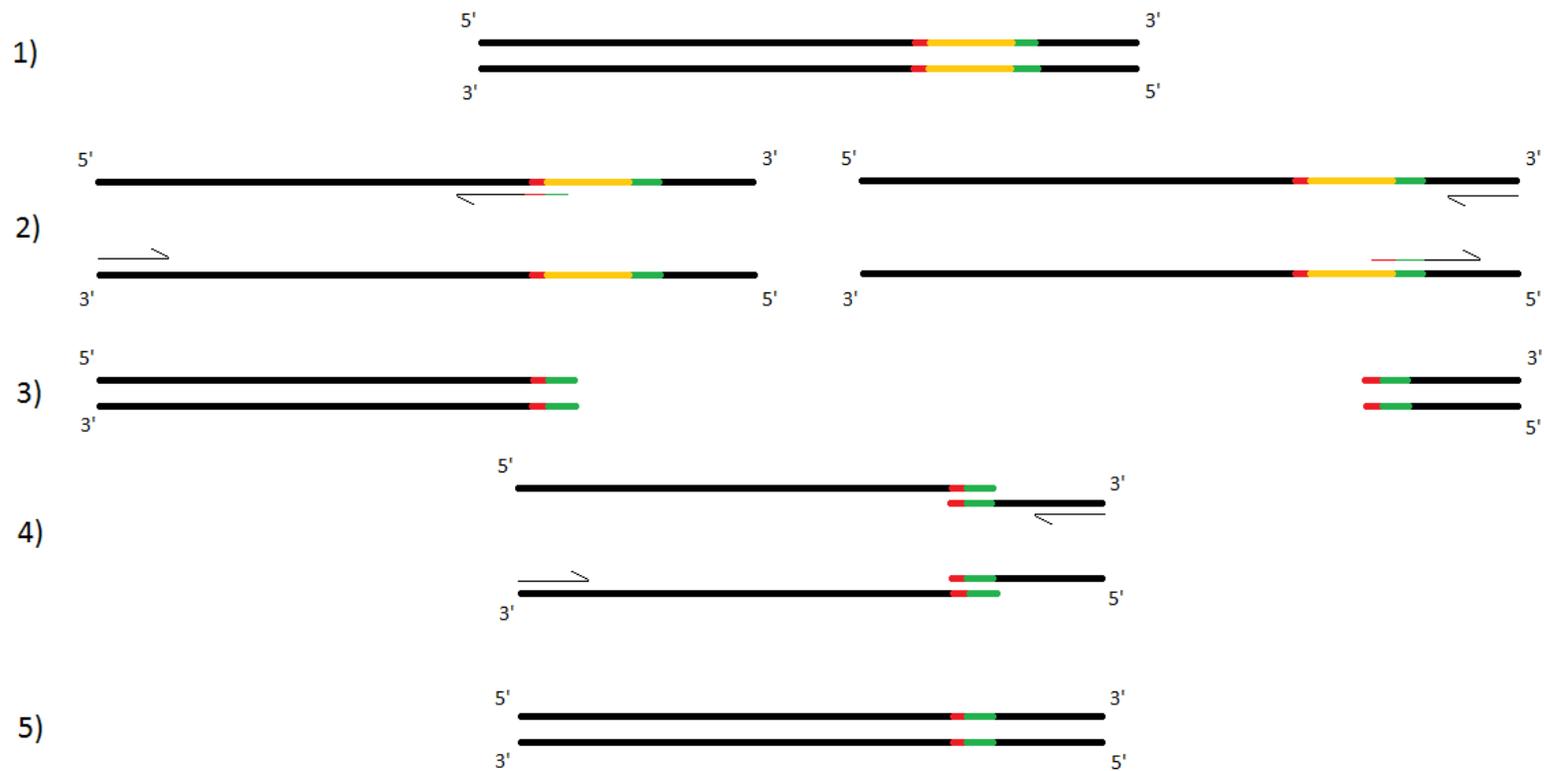
## **2.3 KNOCK-DOWN (KD)**

Le knock-down est une technique qui consiste à inhiber l'expression endogène d'une protéine à l'intérieur de cellules. En insérant à l'intérieur de celles-ci un ARN ayant une séquence complémentaire d'une partie de l'ARN messager de la protéine visée. Cet ARN dit interférant (siRNA) s'hybride et la cellule s'emploie à dégrader ce nouvel ARN double brin via le complexe protéique Dicer et RISC (Carthew and Sontheimer, 2009). La séquence des siRNA utilisés (Qiagen) pour inhiber l'expression de HIP1R est celle qui correspond aux nucléotides 2473 à 2493, siRNA testés antérieurement par Engqvist-Goldstein et al (2004).

La transfection d'ARN interférants a été effectuée à l'aide des réactifs de transfection Polyplus transfection<sup>TM</sup>, en utilisant les concentrations indiquées par le fabricant. Les cellules ont été analysées après 96 heures. Certaines cellules reçoivent un traitement contrôle (mock). Celui-ci consiste à recevoir le même mélange de transfection que les cellules KD, sans les ARN interférants.

## **2.4 QUANTIFICATION DU KD**

Le KD est quantifié en analysant le niveau d'expression de HIP1R dans des cellules KD et des cellules mock. Les cellules sont resuspendues et lysées dans un tampon RIPA (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton). Le surnageant d'une centrifugation de 5 minutes à 10 000 g est récupéré et la quantité de protéines est dosée par la méthode de Bradford. Trois cents à quatre cents  $\mu$ g de protéines sont ensuite analysés par SDS-PAGE pour être certains de bien voir la différence dans la quantité de protéines, puis immunoblot, avec un anticorps primaire contre HIP1R et un anticorps secondaire couplé à la horseradish peroxydase (Abcam). Un contrôle est aussi révélé avec un anticorps primaire contre la CHC, dans le but de s'assurer que le niveau de protéines totales est le même pour les cellules mock que pour les cellules KD. L'analyse du western blot se fait en comparant l'intensité des bandes à l'aide du logiciel ImageJ.



**Figure 7 : Technique de PCR utilisée pour le clonage de GFP-HIP1R ΔL.** 1) L'ADN matriciel utilisé est celui d'HIP1R, avec le domaine Latch illustré en jaune, et bordé en amont d'une séquence nucléotidique illustrée en rouge et en aval par une séquence illustrée en vert. 2) Deux PCR sont faites de façon indépendante. Une première avec une amorce sens se fixant à la partie 3' du brin complémentaire et une amorce anti-sens se fixant en bordure du domaine Latch, contenant une partie de la séquence nucléotidique en aval du domaine Latch. La deuxième PCR fonctionne avec le même principe que la première, avec une amorce anti-sens se fixant à la partie 3' du brin matriciel. 3) Le premier produit de PCR correspond à la partie en amont du domaine Latch en plus d'une partie de la séquence en aval et le deuxième correspond à la partie en aval en plus d'une partie en amont du domaine L. 4) Ces deux ADN serviront de matriciel pour la troisième PCR, avec une amorce sens s'hybridant au début de l'ADN d'HIP1R et une amorce anti-sens s'hybridant à la fin. 5) L'ADN résultant de ces PCR sera celui de GFP-HIP1R ΔL.

**Tableau 2 : Liste des amorces utilisées pour le clonage**

<b>Constructions</b>	<b>Produit PCR généré</b>	<b>Séquence de l'amorce sens (5' → 3')</b>	<b>Séquence de l'amorce anti-sens (5' → 3')</b>
GFP-HIP1R FL	Mégaprimier Insert	CTCAACTCTTGTACCGATTTGATGAAGG GCGCTCGAGAATGAACAGCATCAAGAACGTG	GCGGAATTCCTAGTAGTTCACGAGTTGAGC
GFP-HIP1R ΔA	Insert	GCGCTCGAGACAGTTTCCCGCGGGCC	GCGGAATTCCTAGTAGTTCACGAGTTGAGC
GFP-HIP1R ΔAT	Insert	GCGCTCGAGACAGTTTCCCGCGGGCC	GCGGAATTCCTTGGGTTTCAGTTCCTGGC
GFP-HIP1R Δ L	Matrice (1-2910) Matrice (3042-3204) Insert	GCGCTCGAGAATGAACAGCATCAAGAACGTG CGGCCTGTCCGCATCAGGCAGCCCTGGAG GCGCTCGAGAATGAACAGCATCAAGAACGTG	GGACAGGCCGGAGAAATCC GCGGAATTCCTAGTAGTTCACGAGTTGAGC GCGGAATTCCTAGTAGTTCACGAGTTGAGC
GFP-HIP1R KVK/DDD	Mégaprimier Insert	GCTGGTGGCGGCCTCCGACGATGACGC CAACAAGCACAGCCCC GCGCTCGAGAATGAACAGCATCAAGAACGTG	GCGGAATTCCTAGTAGTTCACGAGTTGAGC
GFP-HIP1R ELL/AAA	Mégaprimier Insert	GCGCTCGAGAATGAACAGCATCAAGAACGTG	CGTTCTTTCTGGCCGCCGCGGTGC GCGGAATTCCTAGTAGTTCACGAGTTGAGC

## 2.5 TRANSFECTION D'ADN

La transfection d'ADN dans les cellules HeLa a été faite avec le kit Polyplus transfection™ selon les indications du fabricant. Les cellules ont été analysées après 24 heures. La transfection d'ADN dans les cellules HEK293T a été faite avec la technique de la précipitation au calcium phosphate (pour des cellules dans des plaques 6 puits : 2 ml de DMEM complet, mélanger 4 µg d'ADN avec 88 µl-x µl ADN de Tris 10 mM pH 7.5. Ajouter 12 µl de CaCl<sub>2</sub> 2M.)

Ce mélange est ajouté à 100 µl de HBS 2X (280 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM HEPES, le tout à pH 7,0), et cette dernière solution est déposée goutte à goutte sur les cellules. Pour les pétris de 10 cm : 8 µg ADN, 440 µl – x µl ADN de Tris 10 mM pH 7.5, 60 µl CaCl<sub>2</sub> 2M, 500 µl HBS 2X. Cette transfection se fait également 24 heures avant l'analyse des cellules.

## 2.6 IMMUNOFLUORESCENCE

Les cellules sont fixées avec du PBS-paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 10 minutes, lavées trois fois avec du PBS (154 mM NaCl, 57,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> monobasique) puis perméabilisées avec du PBS-Triton-X100 (0,2%) pendant 4 minutes. Ces cellules sont ensuite lavées une autre fois avec du PBS, puis bloquées avec du PBS- sérum de chèvre (5%)- albumine de sérum bovin (BSA) (5%) pendant 30 minutes. Elles sont encore lavées avec du PBS une fois puis incubées pendant 1h avec les anticorps primaires ( $\alpha$ -tubuline clone DM1A : Cell signaling, CHC clone X22: Thermo Scientific, Cortactine clone 4F11 : Millipore) dilués dans du PBS-1% BSA. Les cellules sont ensuite lavées dans du PBS trois fois pendant 5 minutes, puis mises en contact avec l'anticorps secondaire chèvre anti-souris-Cy3 (Jackson Immunoresearch) dilués dans du PBS-1% BSA, pendant 45 minutes. Le marquage de l'actine se fait également pendant cette étape, avec la phalloïdine CF™ 350 de Biotium ou la phalloïdine Acti-stain™ 555 de Cytoskeleton, avec les concentrations recommandées par les fabricants. Les cellules sont ensuite encore lavées trois fois pendant 5 minutes avec du PBS, puis, si le noyau doit être marqué, incubées avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma Aldrich) pendant 10 minutes. Un dernier lavage (trois fois 5 minutes) est effectué avec du PBS, et les cellules sont montées sur lames ou laissées dans des plaques de 24 puits avec du PBS. Pour certaines expériences, il est à noter que les cellules marquées avec de la phalloïdine ou pour l' $\alpha$ -tubuline sont fixées et perméabilisées en même temps avec une solution de 20 mM de PIPES pH6,8, 4% PFA, 0,2% Triton-X100, 10 mM EGTA et 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pendant 15 minutes à température de la pièce. Les cellules ont été examinées avec un microscope inversé à fluorescence Axio Observer (Zeiss), à un grossissement de 63 X. Le logiciel utilisé pour l'analyse des images est AxioVision Rel. 4.8.

## 2.7 IMMUNOPRÉCIPITATION (IP)

Le principe de l'IP est de vérifier si une interaction protéique se produit, dans un contexte cellulaire. L'ADN de la protéine d'intérêt est transfecté dans le modèle cellulaire. Ces cellules sont ensuite lysées, et le cytosol est isolé. La protéine d'intérêt est isolée du cytosol à l'aide d'un anticorps et de billes auxquelles l'anticorps peut se fixer. En isolant les billes, on obtient donc la protéine d'intérêt, ainsi que ses partenaires d'interactions, qui peuvent ensuite être mis en évidence par immunoblot.

Trois pétris de 10 cm par condition de transfection ont étéensemencés avec des cellules HEK293T (mock, GFP, HIP1R FL, HIP1R ELL/AAA pour la CHC) (mock, GFP, HIP1R FL, HIP1R  $\Delta$ AT, HIP1R  $\Delta$ L, HIP1R KVK/DDD pour l'actine), pour une confluence de 60% au jour de la transfection. 24 heures après la transfection, les cellules ont été lysées par grattage dans un tampon de lyse (Actine : 200 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,01% SDS, 1% Triton-X100, 0,5  $\mu$ g/ml de leupeptine, 0,5  $\mu$ g/ml d'aprotinine, 0,83 mM de PMSF et 0,23 mM de benzamidine. CHC : 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 1 mM EGTA, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5  $\mu$ g/ml de leupeptine, 0,5  $\mu$ g/ml d'aprotinine, 0,83 mM de PMSF et 0,23 mM de benzamidine) et passées dans une seringue à insuline. Le lysat a été agité pendant 20 minutes à 4°C, puis centrifugé à 15 000 g, 15 minutes à 4°C. Le surnageant est quantifié par la méthode de Bradford et 100  $\mu$ g de protéines est aliquoté pour vérifier l'expression des constructions. Au reste du surnageant est ajouté des billes de protéine-A agarose (40  $\mu$ l de billes (BioShop) pour CHC et 50  $\mu$ l de billes magnétiques (Millipore) pour actine) ainsi que 5  $\mu$ l d'anticorps anti-GFP (Life Technologies). Le protocole d'IP est celui recommandé par les fabricants des billes. Les protéines sont analysées par gel SDS-PAGE puis transférées sur une membrane de nitrocellulose et l'immunoblot final est fait avec un anticorps polyclonal (lapin) anti-GFP (Molecular probes), anti-actine (clone SPM161 : Santa Cruz Biotech) ou anti-CHC polyclonal (lapin).

## 2.8 ENDOCYTOSE DE LA TRANSFERRINE

L'état de l'endocytose dans les cellules HeLa est vérifié par leur capacité à effectuer l'endocytose de molécules de transferrine marquées avec un fluorochrome. On fait en sorte que les récepteurs à la transferrine sont tous prêts à la surface des cellules par une privation de sérum, puis on incube ces cellules avec de la transferrine marquée. Quinze minutes sont allouées aux cellules pour faire l'internalisation de la molécule.

Des cellules HeLa sont incubées pendant au moins 3 heures dans du DMEM sans sérum puis incubées avec 25  $\mu$ g/ml de Dylight™ 549-transferrine (Jackson Immunoresearch) pendant 15

minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées comme mentionné en 2.6, puis l'ADN est marqué avec du DAPI et laissées dans les puits de culture, dans du PBS. Ces cellules sont gardées à 4°C, au noir, jusqu'à l'analyse. Les cellules ont été analysées à l'aide un microscope à fluorescence inversée (EVOS).

## **2.9 EFFET D'HIP1R SUR LA MITOSE**

Des cellules HeLa sont transfectées avec les siRNA puis avec les ADN des différents clones d'HIP1R et fixées, perméabilisées et marquées au DAPI, le tout comme mentionné plus haut. Une plaque de 96 puits a été utilisée par condition : mock (sans siRNA et ADN), KD (sans ADN), HIP1R FL (siRNA + ADN HIP1R FL), HIP1R  $\Delta$ A, HIP1R  $\Delta$ AT, HIP1R  $\Delta$ L, HIP1R ELL/AAA, HIP1R KVK/DDD, GFP (siRNA + ADN GFP). Il est à noter qu'une demie plaque a été utilisée pour les conditions mock et KD. Ensuite, neuf images ont été prises par puits (864 images par plaque), de façon automatique, avec le système ImageXpress MICRO (Molecular Devices), avec un objectif de 20X. Les images ont ensuite été analysées de cette façon : les cellules mitotiques présentant de la fluorescence verte ont été classées selon le stade de la mitose dans lequel elles étaient, classification visuelle faite grâce à l'analyse de la forme du noyau.

## **2.10 ANALYSE DE LA PHOSPHORYLATION D'HIP1R DURANT LA MITOSE**

Deux pétris de 10 cm ont étéensemencés avec des cellules HeLa pour avoir une confluence d'environ 70% le lendemain. Un des deux pétris a été incubé pendant 16h à 37°C avec 50 ng/ml de nocodazole. Les cellules synchronisées en mitose ont été récoltées en agitant ce pétri pour faire décoller les cellules rondes. Ces cellules, ainsi que celles du pétri non synchronisé ont été lavées avec du PBS. Les cellules mitotiques ont été ensuite resuspendues dans 100  $\mu$ l de LSB (Laemmli sample buffer : 6 % SDS, 0,4M sucrose, 0,4M Tris-Cl pH 6.8, 1 %  $\beta$ -mercaptoéthanol, bleu de bromophénol), et les cellules en interphase dans 600  $\mu$ l de LSB pour que les deux fractions aient une quantité de cellules équivalente. Ces deux fractions ont été migrées sur un gel d'acrylamide 7% et transférées sur une membrane de nitrocellulose. La coloration au rouge Ponceau a permis de confirmer qu'une quantité équivalente de protéines avait été chargée sur le gel. La membrane a ensuite été incubée avec un anticorps contre HIP1R.

## **2.11 ISOLATION DES MITOCHONDRIES**

Deux pétris de 15 cm ont étéensemencés avec des cellules HEK293T pour une confluence d'environ 100% le lendemain. Deux lavages au PBS ont ensuite été faits et les cellules ont été lysées en les grattant dans le tampon suivant : 250 mM sucrose, 10 mM Tris pH 7,4, 1

mM EDTA, 0,5 µg/ml de leupeptine, 0,5 µg/ml d'aprotinine, 0,83 mM de PMSF et 23 mM de benzamidine. Elles ont ensuite été passées à l'homogénéisateur : 20 coups à 400 rpm. Elles ont été centrifugées à 600 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a ensuite été recentrifugé à 10 000 g pendant 25 minutes à 4°C. Le culot a été lavé avec le tampon de lyse puis centrifugé à nouveau à 10 000 g pendant 25 minutes à 4°C. Le culot a finalement été resuspendu dans 200 µl de tampon de lyse, migré sur gel d'acrylamide 8% et transféré sur nitrocellulose. La membrane a été incubée avec un anticorps polyclonal (lapin) contre HIP1R, COX-IV (clone 10G8D12C12 : Abcam) et  $\alpha$ -adaptine (clone AP6 : Abcam).

## **2.12 ÉVALUATION DE L'ACTIVATION DE LA CASPASE-9 ET 3 PAR IMMUNOBLOT**

Des cellules HeLa ont été transfectées avec les ADN de HIP1R FL,  $\Delta A$ ,  $\Delta AT$  ou myc-BAK comme contrôle positif (don de Dr John Reed). Ces cellules ont ensuite été lysées dans du RIPA (voir section 2.4) puis les protéines ont été migrées sur gel d'acrylamide 5-16% et transférées sur une membrane de nitrocellulose. La caspase-9 et la procaspase-9 ont été détectées avec un anticorps polyclonal (lapin) détectant ces deux formes (Cell signaling). La caspase-3 a, quant à elle, été détectée avec un anticorps ne détectant que la forme active (clone E83-77 : Abcam).

## **2.13 ÉVALUATION DE L'ACTIVATION DE LA CASPASE-3 PAR FLUORIMÉTRIE**

Des cellules HEK293T ont étéensemencées dans des plaques 6 puits (2 puits par ADN à transfecter). Elles ont ensuite été transfectées avec les ADN d'HIP1R (FL,  $\Delta A$ ,  $\Delta AT$ ), un contrôle positif avec l'ADN de myc-BAK, un contrôle négatif avec l'ADN de mCherry-K14, et un contrôle sans ADN (mock). Le kit Caspase Fluorescent (AFC) Substrate/Inhibitor *QuantiPak*<sup>TM</sup> a été utilisé pour déterminer l'activation de la caspase-3, selon les indications du fabricant (Enzo Life Science International) et en utilisant 30 µg de lysat cellulaire par essai. Les mesures de fluorescence ont été acquises avec un Varioskan (Thermo Scientific) grâce au logiciel SkanIt for Varioskan 2.2.1. Les mesures ont été prises aux 10 minutes pour un total de douze mesures.

## **2.14 ANALYSES STATISTIQUES**

Les moyennes ont été comparées deux à deux avec un test de Student bilatéral avec Excel pour les expériences relative à l'actine et les proportions ont été comparées par un test du  $\chi^2$  pour les expériences relatives à l'endocytose, toujours avec Excel.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

#### 3.1 CLONAGE MOLÉCULAIRE

Plusieurs difficultés ont été rencontrées durant cette étape du projet, empêchant les étapes subséquentes. Premièrement, la mise au point pour le clonage de l'ADN de GFP-HIP1R silent siRNA (GFP-HIP1R FL) a été longue : la technique de la PCR par mégaprimers nécessite beaucoup d'ajustements étant donné la longueur de ce mégaprimers. Aussi, l'intégralité des ADN clonés sont vérifiés par séquençage à la Plateforme de séquençage et de génotypage des génomes du Centre de recherche du CHUQ/CHUL, et les premiers ADN GFP-HIP1R FL obtenus présentaient tous des mutations faux-sens dans leur séquence. Il a donc fallu sélectionner un ADN qui présentait les mutations silencieuses désirées et qui contenait le moins de mutations faux-sens possible.

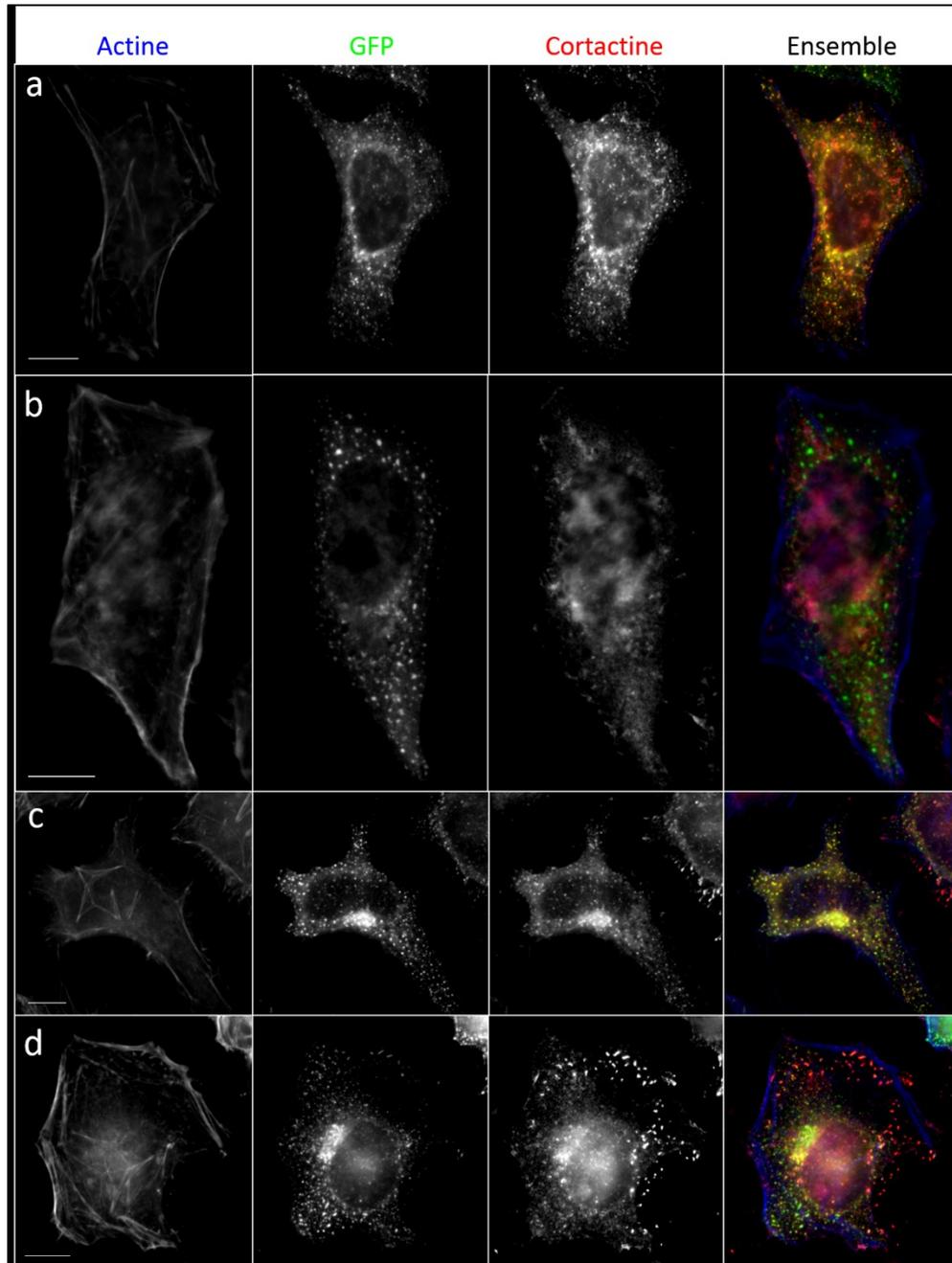
L'ADN choisi avait donc trois mutations qu'il fallait corriger : une thymine en position 394 et en position 829 devait être changée en cytosine, et une guanine en position 1335 devait être changée en cytosine. Ces corrections se sont faites également avec la technique du mégaprimers. Finalement, étant donné que cet ADN servait de matrice pour le clonage des cinq autres, la génération de ces ADN a pris beaucoup plus de temps que prévu.

Finalement, six ADN ont été générés, et présentent tous une mutation silencieuse empêchant les siRNA de dégrader leur ARN messager : GFP-HIP1R FL (acides aminés 1-1068), GFP-HIP1R  $\Delta A$  (149-1068), GFP-HIP1R  $\Delta AT$  (149-771), GFP-HIP1R  $\Delta L$  ( $\Delta 972-1014$ ), GFP-HIP1R <sup>463</sup>ELL/AAA et GFP-HIP1R <sup>922</sup>KVK/DDD. La mutation silencieuse en question est la suivante : au lieu de la séquence nucléotidique <sup>2470</sup>TCCTGCACAGACCTG<sup>2484</sup>, l'ADN contient la séquence TCTTGTACCGATTTG.

La séquence nucléotidique a donc été contrôlée, il fallait ensuite vérifier leur efficacité fonctionnelle. En effet, les constructions ont été choisies selon ce qu'on savait des interactions possibles d'un domaine, mais ce savoir est issu d'expériences faites dans un contexte souvent *in vitro*, avec une protéine fragmentée. Il a donc fallu s'assurer que, par exemple, la construction ELL/AAA ne permettait effectivement plus la liaison à la clathrine. Ceci s'est fait par des expériences de colocalisation en immunofluorescence (IF) et par immunoprécipitation (IP).

### Colocalisation avec l'actine et la cortactine

Pour vérifier la dynamique cellulaire de toutes les protéines de fusion, des IF ont été faites pour déterminer s'il était possible de voir la colocalisation de ces protéines avec les partenaires connus d'HIP1R. La figure 8 montre la colocalisation de GFP-HIP1R FL, GFP-



**Figure 8 : Colocalisation d'HIP1R avec l'actine et la cortactine.** Micrographies représentatives de la colocalisation de GFP-HIP1R FL (a), GFP-HIP1R  $\Delta$ AT (b), GFP-HIP1R  $\Delta$ L (c) et GFP-HIP1R KVK/DDD (d) avec l'actine marquée à la CF<sup>TM</sup> 350 phalloïdine (bleu) et avec la cortactine marquée avec Cy3 (rouge). Barre d'échelle, 10  $\mu$ M. Prises au microscope inversé à fluorescence.

HIP1R  $\Delta$ AT, GFP-HIP1R  $\Delta$ L et GFP-HIP1R KVK/DDD avec l'actine et la cortactine.

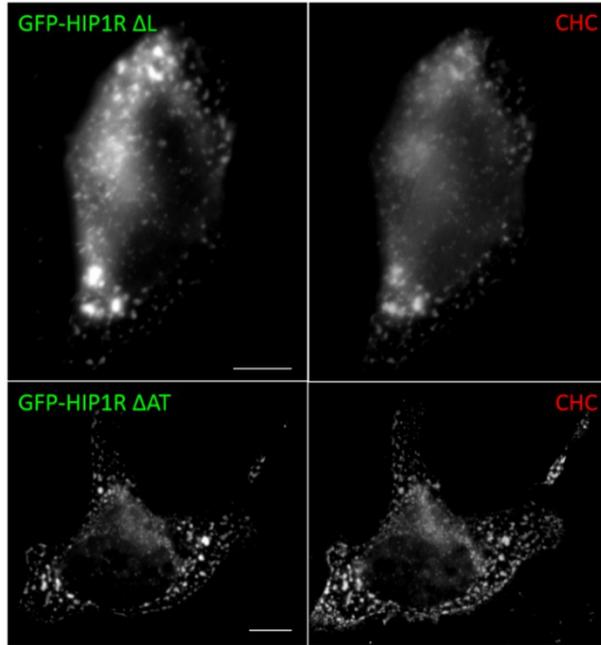
La figure 8 montre donc la localisation de GFP-HIP1R FL (rangée a) par rapport à celle des constructions d'HIP1R empêchant théoriquement la liaison avec l'actine, soient GFP-HIP1R  $\Delta$ AT, GFP-HIP1R  $\Delta$ L et GFP-HIP1R KVK/DDD. Un marquage de l'actine et de la cortactine est également présenté. La construction complète apparaît sous forme ponctuée, et ces ponctuations sont considérées comme étant des vésicules de clathrine (Engqvist-Goldstein et al., 1999). On peut bien voir que la protéine complète colocalise avec la cortactine, mais pas avec l'actine. Ce marquage de l'actine montre surtout les fibres de stress de l'actine-F et il est impossible de voir une colocalisation avec HIP1R. C'est d'ailleurs ce que d'autres équipes ont remarqué : HIP1R reste colocalisé avec la clathrine (Engqvist-Goldstein et al., 1999; Wilbur et al., 2008). On ne peut donc pas vérifier si les constructions d'HIP1R qui doivent empêcher la liaison à l'actine sont efficaces par IF.

Ensuite, la construction GFP-HIP1R  $\Delta$ AT, contrairement à la protéine complète, ne montre pas de colocalisation avec la cortactine. Celle-ci est d'ailleurs beaucoup moins ponctuée que dans les autres micrographies. Le domaine THATCH d'HIP1R contient le site de liaison à la cortactine, il était donc attendu que cette construction empêche cette interaction. Il est cependant intéressant de constater l'effet de la protéine de fusion sur la répartition de la cortactine. Le changement dans la répartition de la cortactine suite au KD d'HIP1R avait également été observé par Engqvist-Golstein et al. en 2004. Il semblerait ici que la cortactine nécessite la présence d'HIP1R pour être recrutée aux vésicules de clathrine.

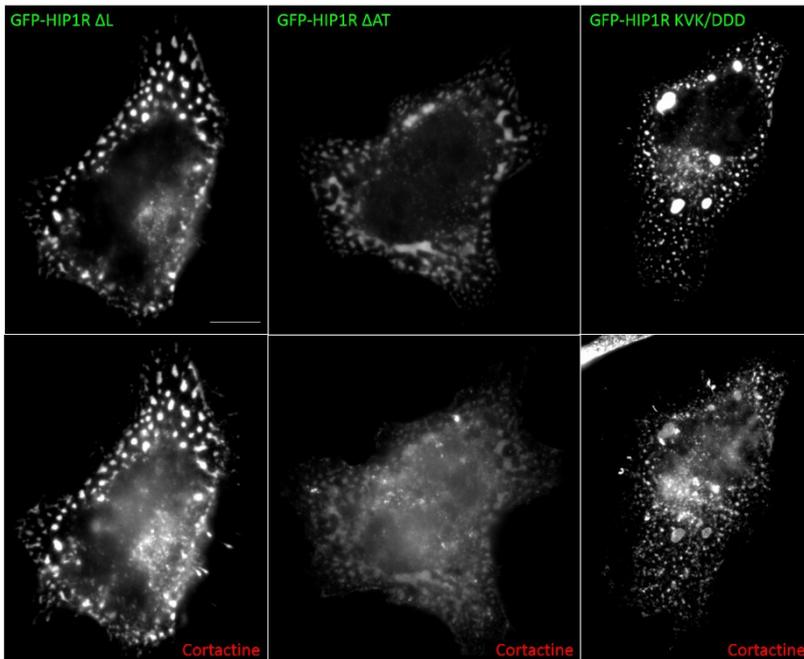
Les constructions GFP-HIP1R  $\Delta$ L et KVK/DDD sont très semblables. Il est d'ailleurs impossible de dire avec ce marquage si la perte de la capacité d'HIP1R à dimériser a un impact autre que d'empêcher la liaison avec l'actine. On remarque également que ces deux constructions, contrairement à GFP-HIP1R FL ou  $\Delta$ AT, semblent s'accumuler particulièrement en région périnucléaire, probablement à l'appareil de Golgi (Carreno et al., 2004). Qu'est-ce qui fait en sorte que GFP-HIP1R  $\Delta$ AT ne se répartit pas de la même façon? Est-ce que la perte du domaine ANTH laisse une protéine trop courte pour qu'elle ait la même dynamique? Il se pourrait que cette protéine soit instable et soit alors transportée vers les lysosomes pour une dégradation ultérieure. Il reste que la perte théorique de la faculté d'HIP1R à se lier à l'actine occasionne cette localisation, ce qui est en accord avec les conclusions tirées par Carreno et al. en 2004, indiquant qu'HIP1R se retrouve au Golgi pour faciliter la progression des vésicules de clathrine du trans-Golgi vers les lysosomes via le cytosquelette d'actine.

On a aussi remarqué que ces trois constructions : GFP-HIP1R  $\Delta$ AT (b), GFP-HIP1R  $\Delta$ L (c) et GFP-HIP1R KVK/DDD (d) présentent toutes trois un phénotype beaucoup plus ponctué que celui de la protéine complète. Ces ponctuations peuvent d'ailleurs être beaucoup plus prononcées, jusqu'à devenir des grosses structures aberrantes colocalisant à la fois avec la clathrine (figure 9) et avec la cortactine (figure 10).

La figure 9 ne présente pas de colocalisation de GFP-HIP1R KVK/DDD avec la clathrine parce que comme cette construction a été clonée en dernier, nous n'avons pas eu la possibilité



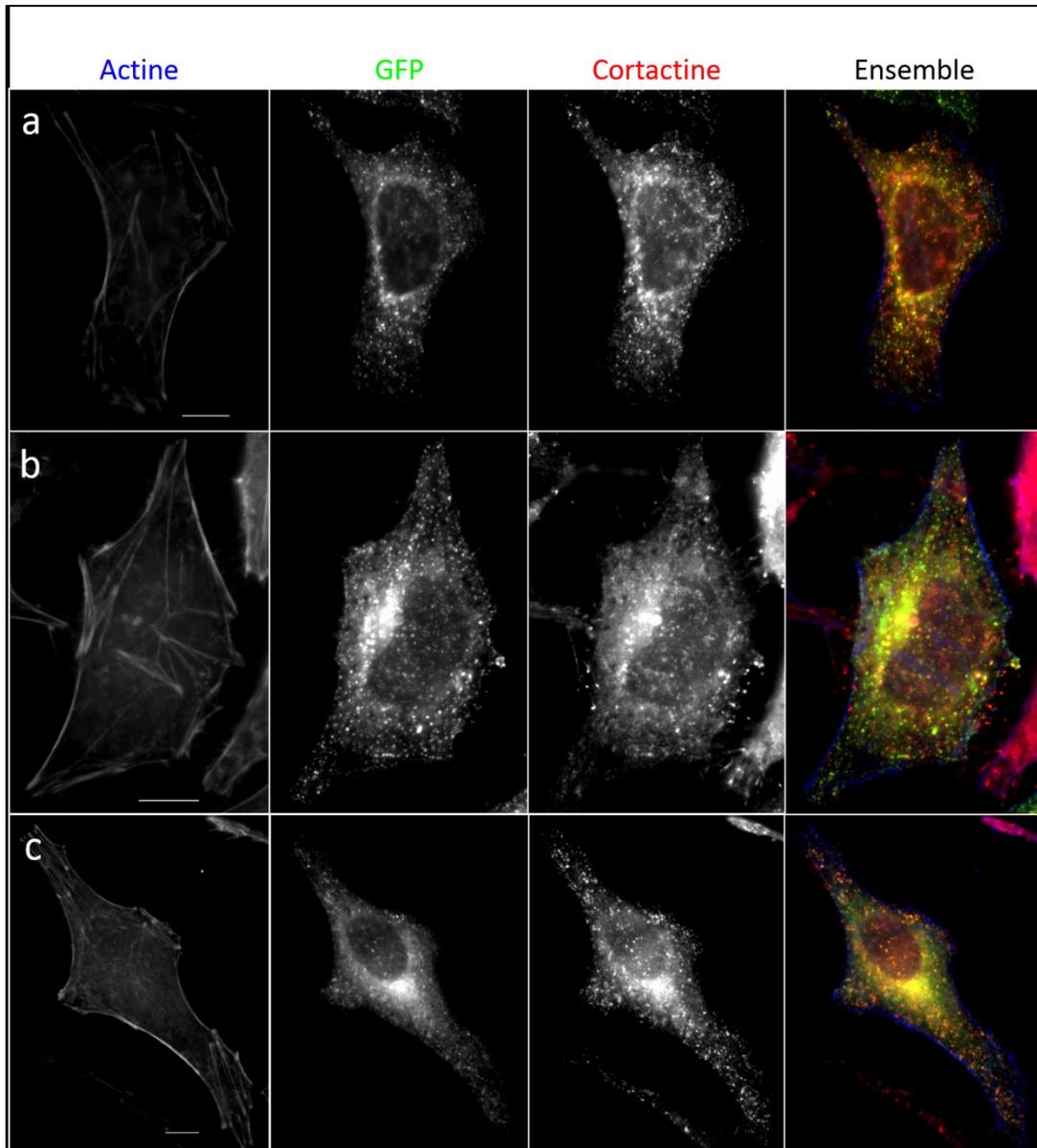
**Figure 9 : Colocalisation des structures d'HIP1R avec la clathrine.** Micrographies représentatives de la colocalisation des structures formées par GFP-HIP1R  $\Delta$ AT ou  $\Delta$ L avec la CHC (rouge). Barre d'échelle, 10  $\mu$ M. Prises au microscope inversé à fluorescence.



**Figure 10 : Colocalisation des structures d'HIP1R avec la cortactine.** Micrographies représentatives de la colocalisation des structures formées par GFP-HIP1R  $\Delta$ AT,  $\Delta$ L ou KVK/DDD avec la cortactine (rouge). Barre d'échelle, 10  $\mu$ M. Prises au microscope inversé à fluorescence.

faire une expérience de colocalisation avec la clathrine.

Le fait que ces trois constructions, empêchant toutes trois la liaison avec l'actine, aient une dynamique cellulaire semblable suggère qu'elles provoquent toutes les mêmes changements par rapport à la protéine de fusion complète, et que ce changement pourrait très bien être la perte de la liaison avec l'actine.



**Figure 11 : Colocalisation d'HIP1R avec l'actine et la cortactine.** Micrographies représentatives de la colocalisation de GFP-HIP1R FL (a), GFP-HIP1R  $\Delta A$  (b), et GFP-HIP1R ELL/AAA (c) avec l'actine marquée à la CF<sup>TM</sup> 350 phalloïdine (bleu) et avec la cortactine marquée avec Cy3 (rouge). Barre d'échelle, 10  $\mu M$ . Prises au microscope inversé à fluorescence.

La figure 11 montre quant à elle la colocalisation de GFP-HIP1R  $\Delta A$  et ELL/AAA aussi avec l'actine et la cortactine en comparaison avec GFP-HIP1R FL.

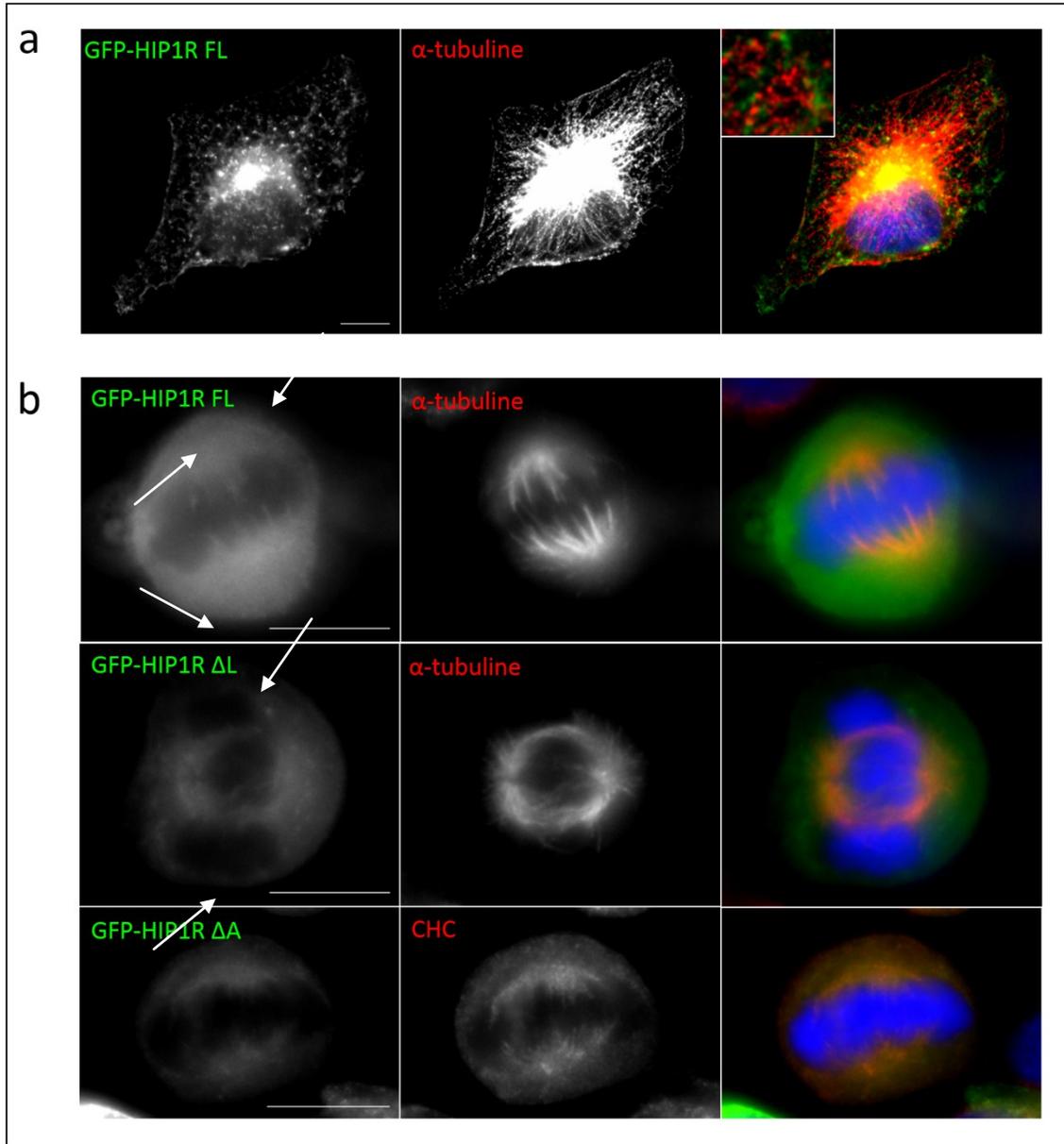
La figure 11 montre que la construction GFP-HIP1R  $\Delta A$  (figure 11b) a une dynamique cellulaire très semblable à celle de la protéine de fusion complète : elle est ponctuée, sans l'être autant que les constructions empêchant l'interaction avec l'actine, et ne forme pas de grosses structures. Elle colocalise avec la cortactine et pas avec les fibres de stress de l'actine. Tout ceci indique qu'HIP1R n'a pas besoin de pouvoir se lier aux phospholipides membranaires pour se retrouver sur les vésicules de clathrine. Finalement, GFP-HIP1R ELL/AAA (figure 11c) a le phénotype le moins ponctué : l'interaction avec la clathrine est théoriquement empêchée et sa répartition est plus diffuse. On voit donc qu'HIP1R ne se retrouve plus dans les vésicules de clathrine. Les quelques petites ponctuations qui sont visibles sont plutôt colocalisées avec la cortactine, et même avec les prolongements de l'actine.

### **Colocalisation avec l' $\alpha$ -tubuline**

Dans le but de déterminer si le domaine ANTH d'HIP1R pouvait permettre une interaction fonctionnelle avec la tubuline, le marquage de l' $\alpha$ -tubuline a été fait, toujours dans des cellules HeLa. La figure 12a montre ce marquage lorsque GFP-HIP1R FL est transfecté, dans une cellule en interphase. On peut bien voir, grâce à l'encadré montrant la superposition des deux fluorescences que ces deux protéines ne colocalisent pas. La liaison montrée par Hussain et al. en 2003 ne s'applique donc pas dans un contexte cellulaire quand HIP1R est complète. Les autres interactions de la protéine semblent avoir priorité sur celle du domaine ANTH avec la tubuline. Le marquage de la tubuline avec les autres constructions d'HIP1R montrent également la même chose lorsque les cellules sont en interphase (résultats non présentés).

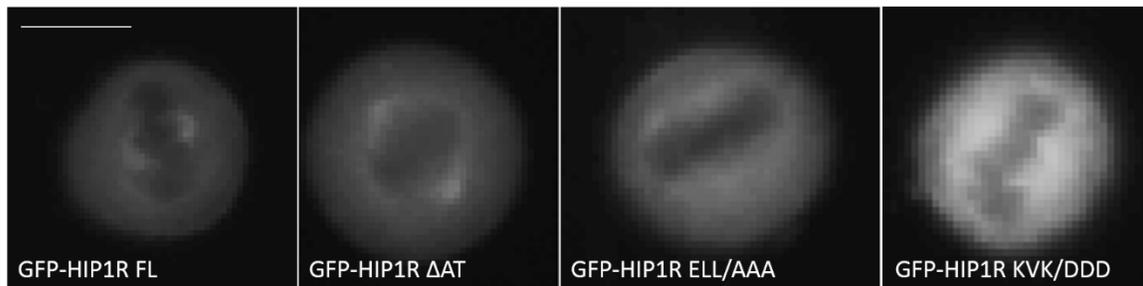
Étant donné qu'HIP1R a un rôle mitotique, et que ce rôle semble être plus important lors de la métaphase (Park, 2010), des cellules dans cette phase de la mitose ont été cherchées pour vérifier si nos constructions permettaient à HIP1R de se retrouver dans les fuseaux mitotiques. Dû au fait qu'un nombre limité de cellules avaient intégré les plasmides GFP, que peu de cellules étaient en mitose, et qu'il y a plusieurs phases à la mitose, il n'y a que pour les constructions FL et  $\Delta L$  que nous avons pu vérifier directement la colocalisation entre la tubuline et HIP1R (figure 12b). Un marquage précédent de la CHC avait cependant permis de trouver une cellule en métaphase transfectée avec GFP-HIP1R  $\Delta A$ , montrant une colocalisation avec la tubuline. Cette cellule est également présentée à la figure 12b. Il est possible de remarquer que pour toutes ces constructions, HIP1R est assez diffuse dans la cellule, mais se concentre aussi sur les prolongements créés par les fuseaux mitotiques, bien illustrés par le marquage de l' $\alpha$ -tubuline

pour les cellules surexprimant GFP-HIP1R FL et  $\Delta L$ , ou le marquage de la CHC dans le cas des cellules surexprimant GFP-HIP1R  $\Delta A$ . Ceci confirme le résultat observé par Park en 2010, et indique que ce ne sont pas les domaines ANTH ou Latch, qui permettent à HIP1R de se trouver sur les microtubules. L'interaction permettant à HIP1R de se lier aux microtubules pourrait alors être dû à la clathrine, via le site <sup>463</sup>ELL.



**Figure 12: Colocalisation d'HIP1R lors de la mitose.** a) Micrographie représentative d'une cellule HeLa en interphase avec un marquage de l' $\alpha$ -tubuline (rouge) et GFP-HIP1R FL. b) Micrographies représentatives de cellules HeLa en métaphase montrant la localisation de GFP-HIP1R FL,  $\Delta L$  ou  $\Delta A$ , avec un marquage de l' $\alpha$ -tubuline (rouge) ou la CHC (rouge). Les flèches soulignent la présence d'HIP1R sur les fuseaux mitotiques. Barre d'échelle, 10  $\mu$ m. Prises au microscope inversé à fluorescence.

Afin de collecter plus de cellules en mitose ayant intégré l'ADN recombinant suite à un KD, une expérience pour vérifier l'effet des différentes constructions d'HIP1R sur la progression de la mitose a été faite à l'Institut de recherche clinique de Montréal (IRCM) (voir la section 3.5). Des images de cellules HeLa ont été acquises de façon automatique sur des champs fixes, avec un grossissement de 20 X. Les images contenant des cellules transfectées avec l'ADN d'HIP1R en métaphase, sont présentées à la figure 13.



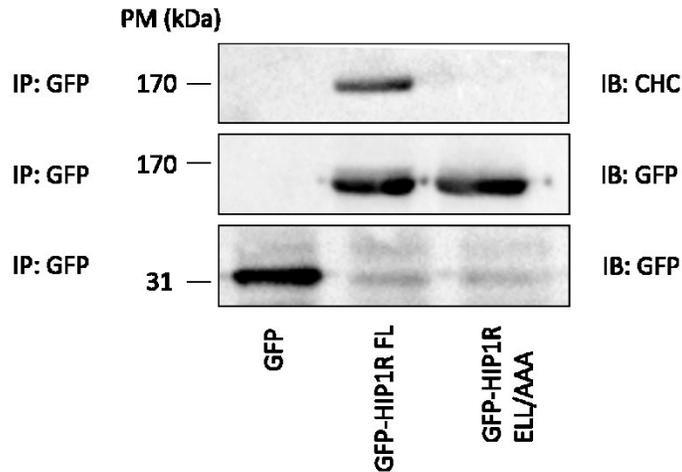
**Figure 13: Cellules en métaphase, transfectées avec différentes constructions d'HIP1R.** Micrographies prises à un grossissement de 20 X avec le système ImageXpress MICRO, puis grossies à 300 %. Barre d'échelle, 10  $\mu$ M.

Malgré que les images de la figure 13 soient loin d'être idéales pour vérifier si il y a une colocalisation entre HIP1R et les microtubules, d'autant plus qu'aucun marquage de la tubuline n'a été fait pour cette expérience, il est possible de distinguer une légère accumulation d'HIP1R FL et  $\Delta$ AT sur ce qui semble être les microtubules ou les centrosomes. Cette accumulation n'est pas aussi claire pour GFP-HIP1R KVK/DDD, et ne semble pas être présente avec la construction ELL/AAA. On ne peut toutefois pas conclure qu'il n'y a pas de colocalisation avec certitude. Par contre, le fait que GFP-HIP1R  $\Delta$ AT semble se retrouver sur les fuseaux mitotiques indiquerait que c'est le domaine CC qui est nécessaire à la capacité d'HIP1R de lier les microtubules via l'interaction avec la clathrine.

### **Immunoprécipitation de GFP-HIP1R**

Pour vérifier si la protéine GFP-HIP1R FL peut faire la liaison avec la clathrine, l'ADN a également été transfecté dans des cellules HEK293T, ainsi que l'ADN de GFP-HIP1R ELL/AAA et GFP. Les protéines ont ensuite été immunoprécipitées avec des billes de protéine A-agarose et des anticorps contre GFP, puis les billes ont été migrées sur gel d'acrylamide et les protéines transférées sur membrane de nitrocellulose. La présence de CHC a été détectée par immunoblot (figure 14).

Le blot révèle que la construction GFP-HIP1R FL permet la liaison à la clathrine et qu'en mutant le site de liaison à la CLC (GFP-HIP1R ELL/AAA), on perd complètement cette interaction, et que l'interaction n'est pas due à la partie GFP de la protéine de fusion.



**Figure 14: Immunoprécipitation (IP) de GFP-HIP1R avec la clathrine** : Les trois lignes présentent les IP et la révélation du blot avec des anticorps contre GFP ou CHC. PM : poids moléculaire en kDa.

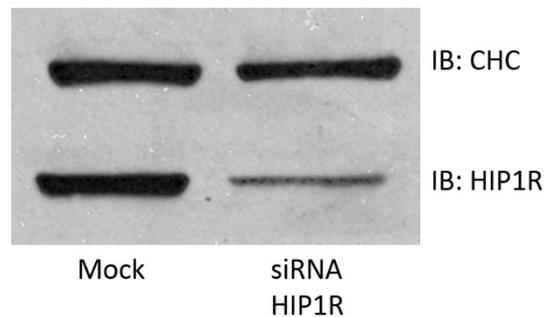
D'autres IP ont été tentées pour vérifier la capacité des protéines de fusion à se lier à la tubuline ou à l'actine. Plusieurs protocoles, tampons de lyse et billes de protéine A-agarose ont été testés pour avoir une coimmunoprécipitation sélective de l'actine ou de la tubuline, mais sans succès. Étant donné la nature filamentaire de l'actine et de la tubuline, ces deux protéines se retrouvaient toujours en bruit de fond.

### 3.2 KNOCK-DOWN D'HIP1R

Pour pouvoir vérifier si ce sont bien les constructions d'HIP1R clonées qui sont responsables des effets cellulaires observés, l'inhibition de l'expression endogène de HIP1R a été faite par knock-down (KD), dans le but de s'assurer que le phénotype observé résulte seulement de l'effet de la protéine de fusion. Le KD est le résultat de l'action d'ARN interférants (siRNA) empêchant l'expression endogène d'HIP1R. Les cellules HeLa dans lesquelles sont transfectés ces siRNA sont incubées pendant 96 heures avant l'analyse, et le taux d'efficacité du KD est mesuré par immunoblot. La figure 15 présente la quantité de protéines dans les cellules traitées versus les cellules contrôles pour une expérience moyenne. Une moyenne de l'efficacité du KD a

d'ailleurs été calculée : sur treize expériences faites, incluant les taux de KD des expériences de KD-restauration des phénotypes par rapport à l'organisation du cytosquelette d'actine (voir section 3.3) et à l'endocytose de la transferrine (voir section 3.4), ainsi que les taux de KD d'expériences de mise au point, l'expression d'HIP1R est réduite de  $85,1 \% \pm 12,8\%$  par rapport aux cellules ayant reçu le mélange de transfection des siRNA (tampon de réaction et réactif de transfection). Il est à noter que sur ces treize expériences, deux essais avaient un taux de KD d'environ 60 % alors que les autres étaient toutes au-dessus de 80 %.

Aussi, puisque la quantité de protéines totales dans les deux échantillons était semblable étant donné que la quantité d'une protéine contrôle (CHC) est à peu près la même, la diminution de la quantité d'HIP1R est donc bien due aux siRNA dirigés contre HIP1R. Le taux d'efficacité du KD de HIP1R est suffisant pour estimer que le phénotype observé est dû à la transfection post-KD des constructions d'HIP1R clonées. Les expériences n'étaient pas continuées si le taux de KD était inférieur à 80 %.

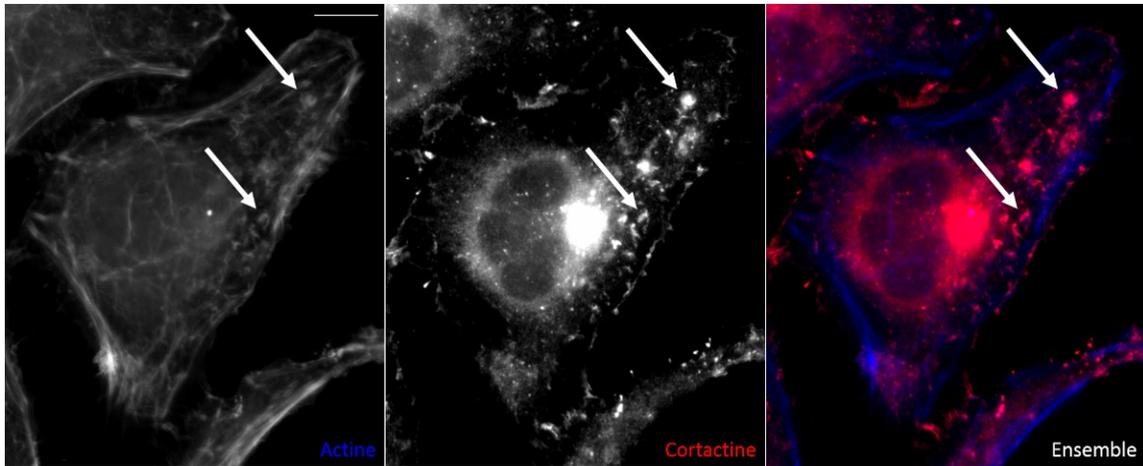


**Figure 15: Effet des siRNA sur HIP1R.** Image représentative de l'efficacité du KD dans les cellules HeLa. Les cellules n'ayant pas reçu de siRNA sont dans la colonne de gauche (mock) et celles les ayant eu sont dans la colonne de droite. La ligne du haut représente la quantité de CHC dans l'échantillon et celle du bas, la quantité de HIP1R. IB : immunoblot.

### 3.3 EFFET D'HIP1R SUR LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE

Pour déterminer quel effet chaque domaine d'HIP1R a sur l'organisation du cytosquelette d'actine, le principe de l'expérience de Engqvist-Goldstein et al. (2004) a été refait. L'expression endogène d'HIP1R a été inhibée avec les siRNA mentionnés plus haut, et l'ADN des différentes constructions d'HIP1R clonées a été transfecté dans des cellules HeLa. Les phénotypes qu'ils ont

décrit ont également été recherchés. Après comparaison entre les cellules mock et KD, un phénotype a été retenu pour déterminer si HIP1R a un effet sur l'organisation de l'actine (figure 16).

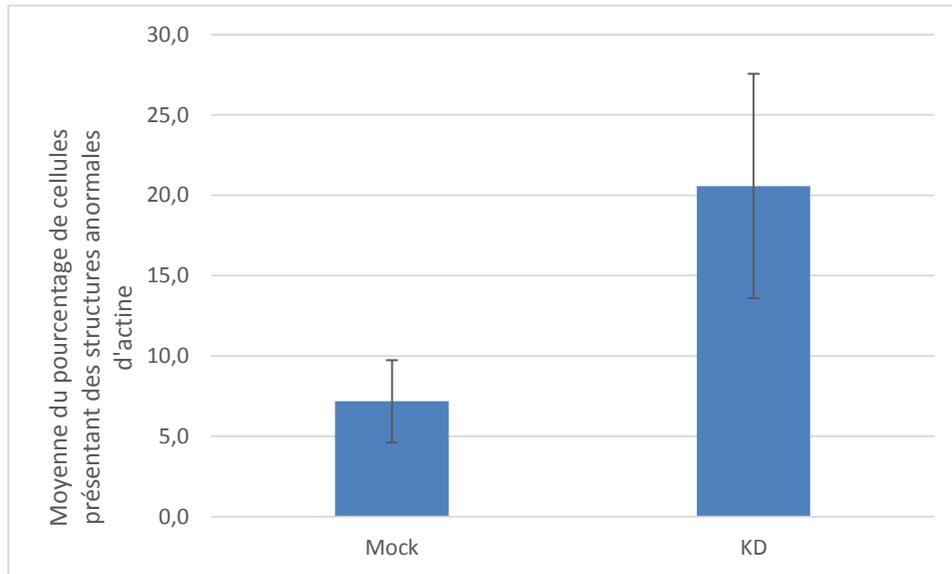


**Figure 16: Phénotype recherché : organisation du cytosquelette d'actine.** Micrographies représentatives de cellules HeLa présentant une organisation du cytosquelette d'actine (en bleu) considérée comme étant anormale. Ces structures d'actine (pointes de flèches) sont colocalisées avec le même genre de structures de cortactine (rouge). Barre d'échelle : 10  $\mu$ m.

Des structures anormales d'actine et de cortactine apparaissent en plus grande proportion dans les cellules KD, comme ce qui avait été décrit précédemment (Engqvist-Goldstein et al., 2004; Le Clainche et al., 2007). Toutefois, les auteurs parlaient d'un effet beaucoup plus fort dans leur expérience que ce qui a été observé ici. Engqvist-Goldstein et al. (2004) retrouvaient ce type de phénotype dans «la plupart des cellules» et Le Clainche et al., (2007) rapportaient ce phénotype dans environ 60-70 % des cellules KD. Ce que nous avons plutôt pu observer est un phénotype beaucoup plus léger, avec, sur trois expériences comptées en duplicata, une moyenne de cellules présentant le phénotype anormal de  $7,2 \pm 2,6$  % chez les cellules mock, vs  $20,6 \pm 7,0$  % chez les cellules KD (figure 17). Cette différence est cependant significative ( $p = 0,001$ ), et on peut conclure que le KD d'HIP1R provoque une désorganisation du cytosquelette d'actine.

Le but de ces trois expériences était de tenter de restaurer le phénotype observé chez les cellules mock avec les différentes protéines de fusion GFP. La première expérience réalisée présentait un bon taux de transfection qui nous a permis de compter plusieurs cellules, alors que les deux autres ont eu un taux de transfection moindre, n'offrant que quelques cellules GFP. Les résultats des trois expériences ont quand même été combinés, puisque les cellules ont été

transfectées de la même façon dans les trois expériences. Le tableau 3 montre le résultat moyen des comptes effectués (voir les résultats bruts en annexe).



**Figure 17: Le KD d'HIP1R provoque une désorganisation du cytosquelette d'actine.** Le graphe représente la moyenne du pourcentage de cellules HeLa présentant des structures d'actine anormales pour les cellules mock et KD, pour trois expériences indépendantes.

**Tableau 3 : Résultats moyens des trois expériences de restauration du phénotype relié à l'actine.** Pourcentage présentant des structures anormales d'actine et de cortactine.

Construction	moyenne	écart-type
Mock	7,2	2,6
KD	20,6	7,0
GFP-HIP1R FL	17,0	8,3
GFP-HIP1R $\Delta$ A	18,2	8,4
GFP-HIP1R $\Delta$ AT	28,0	5,3
GFP-HIP1R $\Delta$ L	26,3	9,7
GFP-HIP1R ELL/AAA	35,4	20,6
GFP-HIP1R KVK/DDD	42,7	15,0

La première chose qu'il faut noter, c'est que la construction complète ne parvient pas à restaurer le phénotype des cellules mock. Les cellules avec GFP-HIP1R FL sont significativement différentes des cellules mock ( $p = 0,02$ ) et qu'il n'y a pas de différence

significative avec la moyenne des cellules KD ( $p = 0,46$ ). Ensuite, en regardant les moyennes des cellules ayant des structures anormales d'actine et de cortactine, on constate facilement que ce chiffre augmente, et qu'aucune construction d'HIP1R n'arrive à restaurer le phénotype.

Il est par contre à considérer que les deux dernières expériences, celles offrant un taux de transfection très inférieur à la première, n'ont probablement pas été optimales, étant donné l'état des cellules sur les lames, à la fin des expériences. Il est possible que, pour une raison non identifiée, la transfection d'ADN ait été plus toxique qu'à l'habitude, et qu'une grande proportion des cellules transfectées se soient décollées des lamelles, ne laissant une proportion anormale de cellules endommagées. Ceci expliquerait la grande variation observée entre l'expérience 1 et les expériences 2 et 3. En effet, si on ne prend que les données de l'expérience 1 (tableau 4, et tableau 5 en annexe pour les résultats bruts), on peut remarquer une légère tendance dans les résultats : la construction complète restaure partiellement le phénotype mock. Il n'y a cependant toujours pas de différence significative avec les cellules KD ( $p = 0,12$ ), mais il n'y en a pas non plus avec les cellules mock ( $p = 0,91$ ), indiquant qu'il s'agit d'un phénotype intermédiaire. Ensuite, malgré qu'il n'y ait aucune différence significative entre la construction complète et les constructions tronquées, la construction GFP-HIP1R  $\Delta$ AT provoque tout de même un phénotype très semblable à celui des cellules KD, et a un seuil de significativité de 0,098 avec GFP-HIP1R FL. Aussi, les constructions GFP-HIP1R  $\Delta$ A et GFP-HIP1R  $\Delta$ L présentent un phénotype aussi intermédiaire entre celui occasionné par GFP-HIP1R FL et GFP-HIP1R  $\Delta$ AT, comme si l'effet de la perte de ces deux domaines était cumulatif. Il faudrait bien évidemment parvenir à reproduire ces résultats pour affirmer quoi que ce soit.

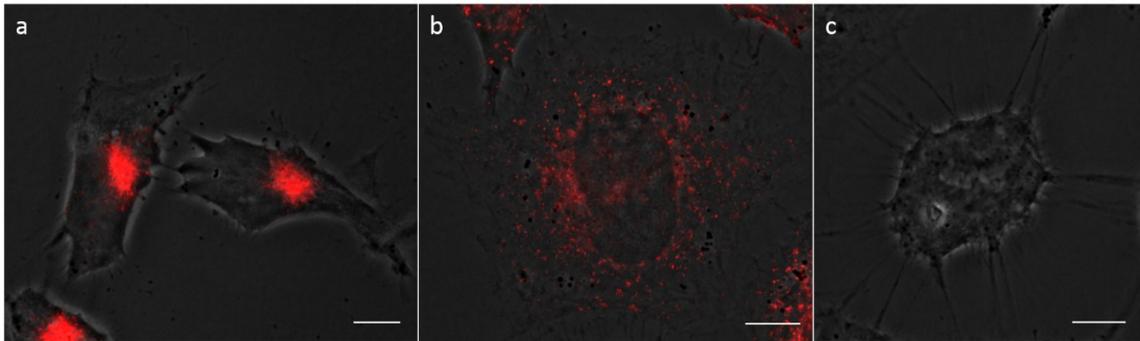
**Tableau 4 : Résultats de la première expérience de restauration du phénotype relié à l'actine.** Pourcentage présentant des structures anormales d'actine et de cortactine.

Construction	Moyenne (%)	écart-type
Mock	10,0	0,5
KD	24,8	6,6
GFP-HIP1R FL	10,3	3,8
GFP-HIP1R $\Delta$ A	15,3	5,2
GFP-HIP1R $\Delta$ AT	26,9	6,9
GFP-HIP1R $\Delta$ L	18,1	9,1
GFP-HIP1R ELL/AAA	13,5	0,6

### 3.4 EFFET D'HIP1R SUR L'ENDOCYTOSE DE LA TRANSFERRINE

Dans le but de déterminer quels domaines d'HIP1R sont importants pour l'endocytose médiée par la clathrine, un KD d'HIP1R a été fait dans des cellules HeLa, puis l'ADN des différentes constructions clonées a été transfecté dans ces cellules. Ces cellules ont ensuite été privées de sérum pendant trois heures et incubées pendant 15 minutes avec de la transferrine marquée avec un fluorochrome rouge. Trois phénotypes différents ont été recherchés (figure 18) : les cellules faisant une endocytose normale de la transferrine (*i.e.* une accumulation de la molécule notable à l'intérieur des cellules), celles faisant une endocytose lente (*i.e.* on remarque de la transferrine dans les cellules, mais pas d'accumulation marquée), puis celles ne faisant pas d'endocytose.

Une première expérience a été réalisée avec un taux de KD d'environ 80 % et une bonne transfection d'ADN. Une deuxième expérience a aussi été réalisée avec un taux de KD cette fois d'environ 90 %, mais une moins bonne transfection d'ADN. Les données brutes de l'expérience 1 et 2 sont en annexe (tableaux 7 et 8).



**Figure 18 : Phénotypes recherchés : endocytose.** a) Cellules HeLa ayant fait une endocytose normale de la Dylight<sup>TM</sup> 549-transferrine. b) Cellule HeLa ayant fait une endocytose de la transferrine lente. c) Cellule HeLa n'ayant pas fait d'endocytose de la transferrine. Barres d'échelle, 10  $\mu$ m.

Les données des deux expériences n'ont pas été combinées puisque les résultats sont très différents d'une expérience à l'autre, laissant penser que potentiellement plusieurs facteurs sont différents d'une expérience à l'autre. En effet, dans la première, le KD d'HIP1R provoque un blocage de l'endocytose de la transferrine chez, en moyenne,  $4,4 \pm 0,04$  % des cellules, alors que ce nombre augmente à  $33 \pm 3,1$  % dans la deuxième expérience. De plus, la double transfection occasionne beaucoup de dommages sur les cellules, et celles de la deuxième expérience (tableau 8) ont été beaucoup plus marquées par ces dommages, ce qui fait que le phénotype qui en résulte n'est peut-être pas tout à fait représentatif. Finalement, la différence entre les phénotypes n'est

pas toujours flagrante et laisse beaucoup de place à l'interprétation. Les résultats peuvent varier (surtout entre les phénotypes «normale» et «lente»). Nous avons tenté d'utiliser la cytométrie de flux pour enlever ce biais dû à l'observateur, mais la quantité de fluorescence n'était pas suffisante pour voir une internalisation claire. Il se peut aussi qu'il y ait un autre facteur interne à l'expérience (*e.g.* le nombre de passages que les cellules ont eu) qui explique cette différence.

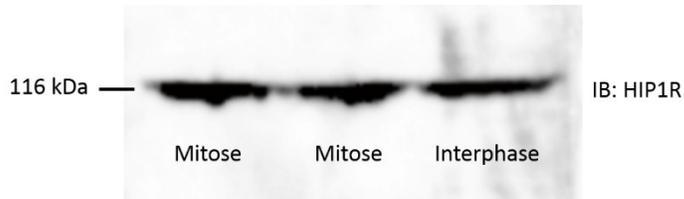
En prenant les expériences séparément, on remarque tout de même une différence significative entre les cellules mock et KD ( $p = 0,000$  pour la première et  $p = 0,001$  pour la deuxième). La différence la plus marquante entre les différents groupes est celle des cellules n'ayant pas fait l'endocytose (tableaux 7 et 8), à cause des écart-types très petits.

Ensuite, dans les deux cas, lorsque les constructions d'HIP1R ont été réintroduites dans les cellules, la construction GFP-HIP1R FL n'est pas parvenue à restaurer le phénotype. Il n'y a pas de différence significative entre les cellules KD et exprimant GFP-HIP1R FL ( $p = 0,89$ ) pour la première. Aussi, la réintroduction de la construction complète dans la deuxième expérience engendre un moins grand nombre de cellules considérées comme étant normales. D'ailleurs, aucune autre construction ne parvient à restaurer le phénotype dans les deux expériences. Le KD d'HIP1R a un effet sur l'endocytose de la transferrine, mais sa réintroduction n'a pas d'effet. L'effet remarqué est alors sans doute dû à la technique de transfection des siRNA, ou bien au manque d'HIP1R dans un autre rôle (par exemple dans la mitose), et que la transfection transitoire de la protéine de fusion ne dure pas assez longtemps pour permettre aux cellules de retrouver leur fonction perdue.

### **3.5 EFFET D'HIP1R SUR LA MITOSE**

Il a été montré qu'HIP1R a un rôle dans la mitose; elle se positionne sur les fuseaux mitotiques et aide à ce que les chromosomes soient bien alignés (Park, 2010). On ne sait par contre pas quel est le mécanisme derrière le changement de rôle d'HIP1R. Plusieurs protéines de l'EMC se font phosphoryler durant la mitose (Chen et al., 1999; Fielding and Royle, 2013; Floyd et al., 2001), ce qui leur confère la possibilité de changer de rôle. Comme il a été montré qu'HIP1R pourrait être phosphorylée durant la mitose (Dephore et al., 2008) et que certaines protéines ont une taille moléculaire augmentée lorsque phosphorylée (Chen et al., 1999), nous avons cherché à vérifier si la phosphorylation d'HIP1R pouvait être confirmée par immunoblot.

Deux extraits de cellules HeLa synchronisées en mitose avec du nocodazole ont été migrés sur un gel à 7% d'acrylamide à côté d'un extrait de cellules en interphase (figure 19).

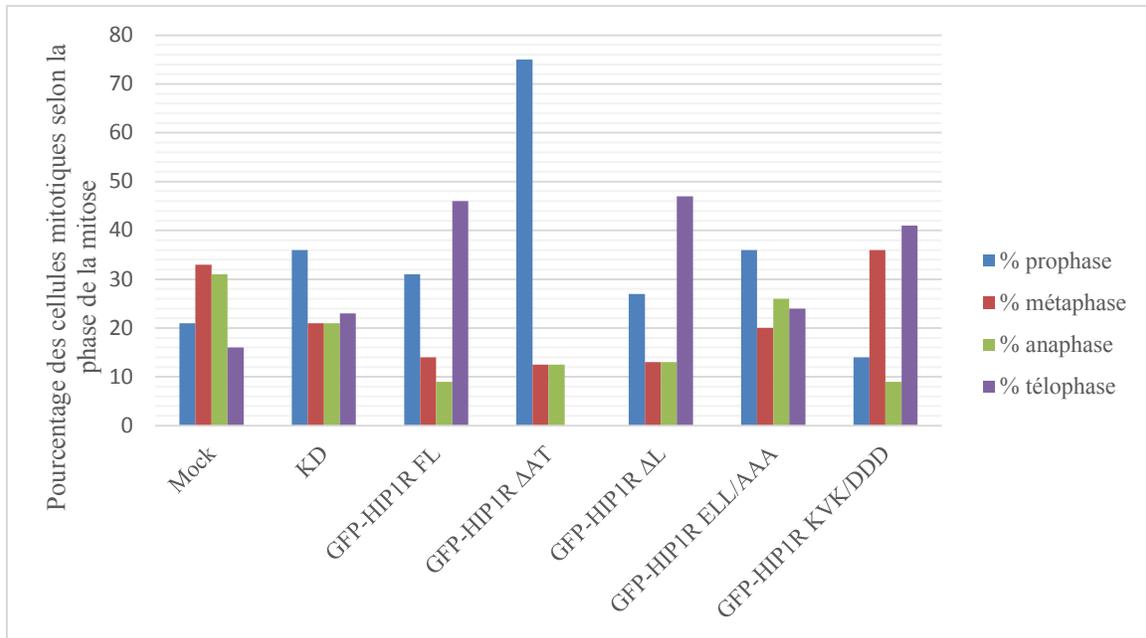


**Figure 19: Immunoblot montrant le poids moléculaire d'HIP1R** issu de deux pétris différents de cellules HeLa synchronisées en mitose avec du nocodazole et d'un pétri de cellules HeLa non synchronisées (interphase).

La figure 19 montre qu'il n'y a pas d'augmentation apparente dans le poids moléculaire d'HIP1R entre l'interphase et la mitose. Ceci implique que soit le gel d'acrylamide de 7% de permet pas séparer suffisamment les deux versions d'HIP1R, soit que cette phosphorylation n'a pas lieu. Une autre méthode doit être employée pour confirmer le résultat de Dephoure et al. obtenu en 2008.

Dans son article de 2010, Park a également montré que le KD d'HIP1R entraîne un retard dans la complétion des phases de la mitose. Une expérience a donc été faite pour vérifier si une des constructions clonées provoque des retards dans la progression de la mitose par rapport à la construction FL. Des plaques de 96 puits ont étéensemencées avec des cellules HeLa, transfectées avec des siRNA contre HIP1R, puis avec les ADN des six constructions d'HIP1R ou avec l'ADN de GFP. Des micrographies ont été prises des cellules, et le nombre de cellules en mitose pour chaque ADN transfecté a été comptabilisé, ainsi que le nombre de cellules en mitose pour les cellules mock et KD. La phase de la mitose de ces cellules a été évaluée par la forme du noyau marqué au DAPI, sur les images prises avec un grossissement de 20 X.

La figure 20 montre l'effet du KD d'HIP1R et la réinsertion des mutants sur la complétion du processus mitotique dans des cellules HeLa. Avec cette figure, on peut remarquer que HIP1R participe à ce que les cellules HeLa progressent plus rapidement à travers le processus mitotique : 21 % sont en prophase, alors que ce chiffre augmente à 36 % lorsqu'HIP1R n'est pas dans les cellules. Ceci est en accord avec ce que Park a démontré en 2010. Il a remarqué un blocage en prophase des cellules KD par rapport aux cellules contrôles. L'intérêt de notre étude, c'est de vérifier si ce retard est réellement dû au manque d'HIP1R ou plutôt dû à la technique employée, en essayant de restaurer le phénotype contrôle avec la construction d'HIP1R complète.



**Figure 20: Effet du KD d'HIP1R et de la réinsertion des mutants sur l'avancement de la mitose dans des cellules HeLa.** Pourcentage des cellules selon les phases de la mitose (prophase, métaphase, anaphase ou télophase), avec (mock) ou sans (KD) HIP1R, et suite à la transfection avec les différents ADN recombinants d.HIP1R.

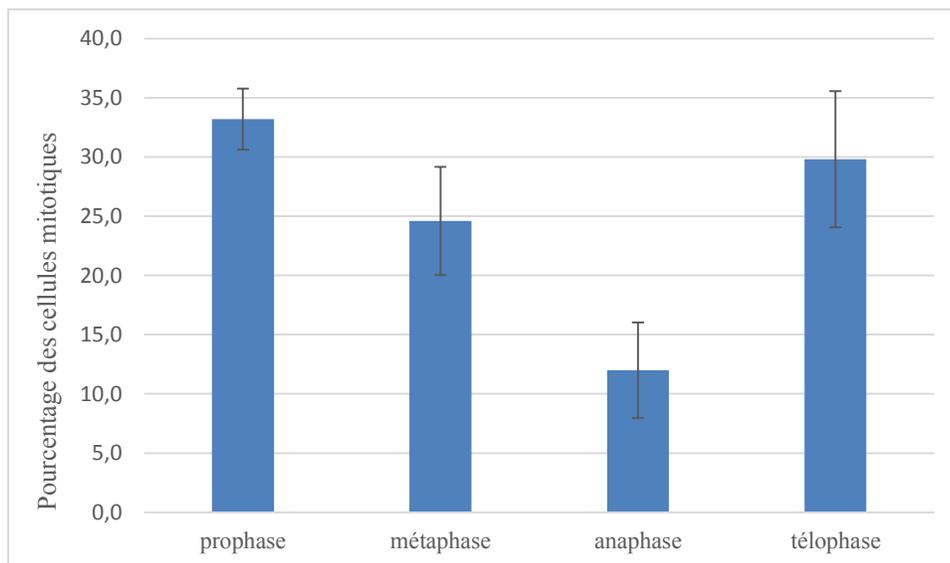
Il est à noter que la transfection de l'ADN de GFP-HIP1R  $\Delta A$  n'a pas fonctionné, nous empêchant d'avoir des résultats pour cette construction. La première chose que l'on peut remarquer, c'est que la construction complète a un profil de distribution qui ne correspond ni aux cellules mock, ni aux cellules KD (figures 20). En effet, une plus grande proportion des cellules transfectées en mitose se retrouvent en télophase, comme si la construction a accéléré la progression du processus. D'un autre côté, il y a plus de cellules en prophase qu'en métaphase ou en anaphase, comme si elle bloque aussi le processus, un peu comme pour les cellules KD. Ensuite, les cellules ayant reçu GFP-HIP1R  $\Delta L$  se comportent de la même manière que les cellules avec GFP-HIP1R FL, laissant sous-entendre que si HIP1R a un effet dans la mitose, ce n'est pas grâce à sa capacité à lier l'actine. Quant aux cellules avec GFP-HIP1R ELL/AAA, elles se comportent tout à fait comme les cellules KD : ceci laisse croire que la liaison avec la clathrine est importante pour le rôle mitotique d'HIP1R.

La construction GFP-HIP1R KVK/DDD a un autre profil de dispersion : malgré qu'elle présente également un nombre élevé de cellules en télophase, c'est plutôt la métaphase qui récolte un plus grand nombre de cellules que la prophase. Ce résultat indique que la liaison à l'actine pourrait avoir un rôle à jouer dans le passage de la métaphase à l'anaphase. Ceci est tout de même

peu probable, étant donné que les deux autres constructions empêchant cette interaction ne provoquent pas le même phénotype.

Finalement, la construction GFP-HIP1R  $\Delta$ AT présente le plus grand retard dans le passage à la métaphase. Malgré que cette construction possède bien le site de liaison à la clathrine, il reste que cette protéine de fusion est largement réduite par rapport à la protéine complète. Ceci pourrait occasionner des changements dans la structure de la protéine qui lui empêcherait de fonctionner normalement. Ceci pourrait par contre aussi vouloir dire que le domaine ANTH, celui permettant potentiellement à HIP1R de se lier à la tubuline (Hussain et al., 2003), est important pour le rôle mitotique d'HIP1R. Cette réponse aurait pu être apportée par la construction GFP-HIP1R  $\Delta$ A. Il faut cependant faire attention avec tous ces résultats avant de statuer quoi que ce soit sur l'implication des différents domaines d'HIP1R dans la mitose : le nombre de cellules transfectées et en mitose est très faible (allant de 8 pour  $\Delta$ AT, à 35 pour FL, voir le tableau 9 en annexe pour plus de détails).

Dans les plaques traitées aux siRNA puis transfectées avec de l'ADN, plusieurs cellules ont été trouvées en mitose, sans qu'elles ne présentent de fluorescence verte : elles sont donc à très grande majorité KD et nous permettent de comparer les plaques entre elles et de déterminer si le changement dans les proportions est bien dû à la construction d'HIP1R reçue et non à la méthode employée. Ces données sont présentées à la figure 21.



**Figure 21: Moyenne des pourcentages des cellules HeLa KD dans les différentes phases de la mitose.** Le graphe représente le pourcentage de cellules dans les différentes phases de la mitose pour des cellules HeLa KD n'ayant pas reçu la construction transfectée.

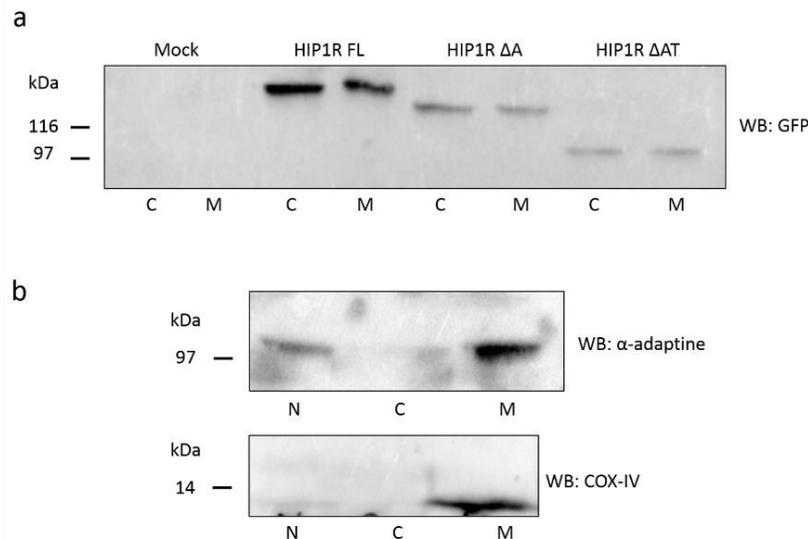
On peut voir que malgré que le profil mitotique des plaques soit légèrement différent de la plaque KD, tous ces profils sont semblables entre eux, laissant toujours au moins autant de cellules en prophase que dans les autres phases. Ce qui diffère le plus par rapport à la plaque KD, c'est la proportion de cellules en télophase. Ceci fait d'ailleurs penser aux résultats obtenus avec cellules transfectées avec GFP-HIP1R FL ou GFP-HIP1R  $\Delta$ L. L'augmentation du nombre de cellules en télophase est peut-être donc dû à la transfection d'ADN comme telle, et le fait que cette proportion ne soit pas augmentée avec les cellules ayant reçu GFP-HIP1R  $\Delta$ AT ou ELL/AAA est simplement dû au fait que trop de cellules sont encore bloquées en prophase. Qualitativement, les cellules KD montrent une plus grande difficulté à compléter la cytokinèse par rapport aux cellules mock. Park (2010) a noté le même genre d'observation : il a montré que le nombre de cellules multinucléées était plus élevé chez les cellules KD que chez les cellules mock.

### **3.6 EFFET D'HIP1R SUR L'APOPTOSE**

Il a été montré que HIP1R induit l'apoptose via sa liaison avec la protéine anti-apoptotique Bcl-B et que cette apoptose se fait avec le concours de BAK et que le tout résulte en l'activation de la caspase-9. Les domaines importants d'HIP1R dans sa liaison avec Bcl-B sont les domaines ANTH et THATCH (Kim et al., 2009). Il est intéressant que ce soit ces deux domaines, situés aux deux extrémités de la protéine, qui sont importants pour la liaison avec Bcl-B. En effet, le domaine central CC ne semble pas affecter la liaison (Kim et al., 2009). Étant donné qu'HIP1R a un domaine BH3 théorique dans le domaine THATCH (Hawley et al., 2012), la nécessité de ce domaine pour la liaison n'est pas étonnante. Il en est autrement pour le domaine ANTH. Nous avons émis l'hypothèse que ce domaine pourrait servir de domaine d'ancrage différent de la membrane plasmique, pour que le rôle d'HIP1R puisse encore une fois changer, mais cette fois lors de l'apoptose. Le mécanisme de l'activation de l'apoptose du duo HIP1R/Bcl-B nécessite BAK (Kim et al., 2009), une protéine qui, lors de l'apoptose, se lie aux mitochondries et forme des pores dans la membrane externe de celles-ci, permettant aux protéines intermembranaires d'être libérées et d'induire l'apoptose (Alberts et al., 2008). Aussi, la membrane externe des mitochondries contiennent des phosphatidylinositols (van Meer et al., 2008), lipides avec lesquels le domaine ANTH est capable de se lier (Hyun et al., 2004b). Il serait donc théoriquement possible que HIP1R puisse se lier à la membrane externe des mitochondries, et que ce soit la raison pour laquelle le domaine ANTH d'HIP1R est aussi important dans la liaison avec Bcl-B.

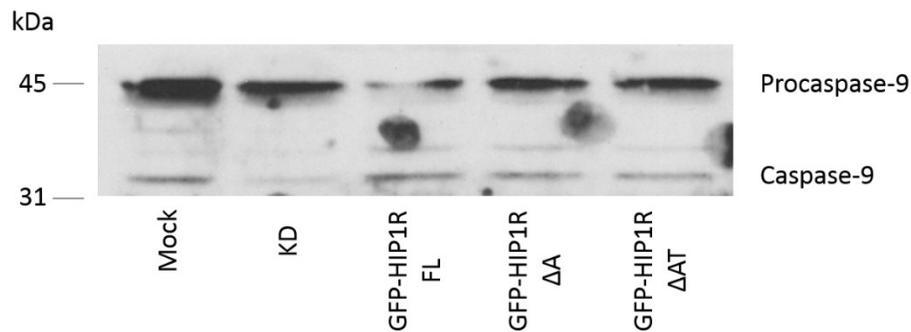
Nous avons donc surexprimé les constructions GFP-HIP1R FL,  $\Delta A$  et  $\Delta AT$  dans des cellules HEK293T, puis avons isolé les mitochondries et le cytosol avec un protocole classique pour faire migrer les extraits sur gel d'acrylamide et donc vérifier si il y a un enrichissement d'HIP1R dans les mitochondries. La figure 22 montre le résultat obtenu.

Nous avons donc vérifié si HIP1R pouvait se retrouver dans les mitochondries. Comme nous ne remarquons pas de différence entre la fraction mitochondriale et la fraction cytosolique en terme de quantité d'HIP1R (figure 22 a), nous avons vérifié si le protocole d'isolation que nous utilisons était efficace pour n'isoler que les mitochondries. Un immunoblot a été fait contre l' $\alpha$ -adaptine, un marqueur des vésicules de clathrine et contre COX-IV, une protéine de la membrane mitochondriale (figure 22 b). Celui-ci a révélé que le protocole d'isolation utilisé n'isole pas uniquement les mitochondries, mais aussi d'autres structures, étant donné la présence des vésicules de clathrine. On peut toutefois estimer qu'HIP1R ne se fixe pas aux mitochondries étant donné qu'il y a la même quantité de la protéine dans les deux fractions : si HIP1R se fixe aux mitochondries, on s'attend à ce que la fraction «mitochondriale» soit enrichie en HIP1R, puisque les vésicules de clathrine ont sédimenté avec les mitochondries. Ce n'est donc pas pour ancrer HIP1R aux mitochondries que le domaine ANTH d'HIP1R lui permet de se lier à Bcl-B.



**Figure 22: Présence d'HIP1R dans les mitochondries.** a) Les fractions mitochondriales (M) et cytosoliques (C) de cellules HEK293T transfectées avec GFP-HIP1R FL,  $\Delta A$  ou  $\Delta AT$  ont été chargées sur un gel d'acrylamide puis transférées et révélées par immunoblot avec un anticorps anti-GFP. b) Les fractions N (noyaux), C (cytosol) et M (mitochondries) ont été chargées sur un gel d'acrylamide puis transférées et révélées par immunoblot avec un anticorps anti-COX-IV ou anti- $\alpha$ -adaptine.

Nous avons également cherché à savoir si la perte de ces deux domaines influençait la capacité d'HIP1R à induire l'apoptose, parce que malgré que Kim et al. (2009) aient montré que ces deux domaines sont responsables de la liaison HIP1R/Bcl-B et que ces deux protéines entraînent l'activation de la caspase-9, ils n'ont pas testé leurs constructions d'HIP1R (148-1068, 1-816, 148-816 et  $\Delta$ 336-606) dans l'activation de la caspase-9. Nous avons donc surexprimé GFP-HIP1R FL,  $\Delta$ A et  $\Delta$ AT dans des cellules HeLa et mesuré la différence dans l'activation de la caspase-9 avec des cellules contrôles (figure 23).

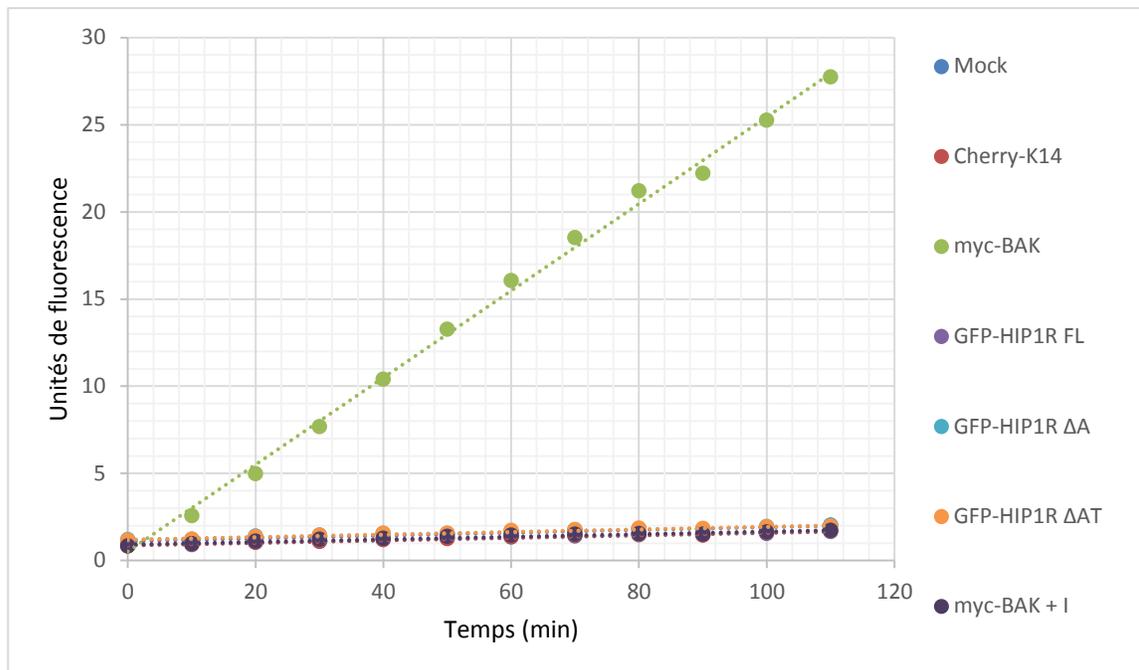


**Figure 23: Activation de la caspase-9.** Immunoblot de la caspase-9, clivée à partir de la procaspase-9. Les protéines de cellules HEK293T mock, KD ou KD et transfectées avec GFP-HIP1R FL,  $\Delta$ A ou  $\Delta$ AT ont été migrées sur gel d'acrylamide, transférées puis révélées par immunoblot avec un anticorps anti-procaspase/caspase-9.

La figure 23 montre qu'il y a un effet du KD d'HIP1R sur l'activation de la caspase-9. En faisant un ratio de la quantité de la caspase-9 sur la procaspase-9 à l'aide du logiciel ImageJ, on trouve que seulement 6% de la procaspase-9 se fait cliver dans les cellules KD, par rapport à 16% pour les cellules mock. En transfectant de l'ADN d'HIP1R suite au KD, on trouve 33% de la procaspase-9 qui est clivée pour GFP-HIP1R FL, 17% pour  $\Delta$ A et 16% pour  $\Delta$ AT. Il y aurait donc un effet de la perte des domaines ANTH et THATCH, comme l'ont avancé Kim et al. (2009), mais également de la perte seule du domaine ANTH. Le fait que la construction FL augmente le taux de caspase-9 clivée par rapport aux cellules mock est probablement dû à la double transfection qui a un effet néfaste pour les cellules. Cette expérience laisserait sous-entendre que seul le domaine ANTH est nécessaire à l'induction de l'apoptose par HIP1R, étant donné que dans cet essai, l'effet de la perte du domaine THATCH n'augmente pas la quantité de caspase-9. Il faut par contre évidemment répéter ces résultats pour vraiment pouvoir tirer des conclusions.

Nous avons ensuite essayé de voir par immunoblot l'effet d'HIP1R sur l'activation de la caspase-3, une caspase bourreau ayant un rôle subséquent à celui de la caspase-9. Lorsque les cellules entrent en apoptose via l'activation de la caspase-9, la caspase-3 sera ensuite elle aussi activée (Alberts et al., 2008). L'activation de la caspase 3 n'a pas pu être vérifiée par immunoblot en raison de la quantité de cellules nécessaires pour obtenir un signal avec l'anticorps anti-caspase 3 utilisé. Nous avons alors utilisé le kit Caspase Fluorescent (AFC) Substrate/Inhibitor *QuantiPak*<sup>TM</sup> (Enzo Life Science International) pour avoir une mesure plus quantitative de l'activité de la caspase 3 et ce, en ayant besoin de beaucoup moins de protéines (30 µg vs plus de 300 µg).

Des cellules HEK293T ont donc été transfectées pour surexprimer les constructions GFP-HIP1R FL, ΔA, et ΔAT, ainsi qu'un contrôle Cherry-K14, pour vérifier que la transfection comme telle n'a pas d'effet. On s'attend donc à ce que si les mutants d'HIP1R entraînent l'apoptose, qu'ils augmentent la quantité de caspase-3 clivée. Le kit a été employé et la fluorescence émise par la présence de la caspase-3 a été mesurée et la figure 24 est représentative de trois expériences indépendantes réalisées aussi bien avec des cellules HEK293 que des cellules HeLa.



**Figure 24: Activation de la caspase-3.** Graphique représentant la présence de caspase-3 activée, détectée par une réaction entre celle-ci et le substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC. Les contrôles sont les cellules transfectées avec aucun ADN (mock), Cherry-K14 et l'ajout d'un inhibiteur de la caspase-3 (+ I).

La figure 24 montre que seul myc-BAK, une protéine de fusion proapoptotique, induit une activation claire de la caspase-3, et donc de l'apoptose. Que ce soient le contrôle de transfection (Cherry-K14) ou les constructions d'HIP1R, le taux d'activation de la caspase-3 est le même que lorsqu'un inhibiteur de la caspase-3 est ajouté à la réaction. HIP1R seul, n'induit alors pas l'activation de la caspase-3, et donc l'apoptose.



## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

#### 4.1 CLONAGE MOLÉCULAIRE

Une première construction d'ADN a été clonée. Cette construction, GFP-HIP1R FL (FL = «full length», complète) contient une mutation silencieuse qui permet à l'ARN messager de la protéine de fusion de ne pas être dégradé lors des expériences de KD, ce qui est confirmé par les immunofluorescences. Comme toutes les constructions clonées, l'ADN de cette protéine a été envoyé à séquencer à la Plateforme de séquençage et de génotypage des génomes du centre de recherche du CHUL/CHUQ. L'intégrité de l'ADN est donc assurée. Cette construction a ensuite servi de matrice pour cloner les cinq autres ADN : GFP-HIP1R  $\Delta$ ANTH, GFP-HIP1R  $\Delta$ ANTH $\Delta$ THATCH, GFP-HIP1R  $\Delta$ Latch, GFP-HIP1R ELL/AAA et GFP-HIP1R KVK/DDD.

On sait donc que ces constructions sont les bonnes grâce au séquençage, mais étant donné qu'elles ont été conçues à partir de données sur les fonctions des domaines d'HIP1R obtenues principalement dans des expériences *in vitro* dans un contexte où ces domaines étaient isolés. On ne sait donc pas avec certitude si les différents mutants empêchent effectivement leurs liaisons théoriques. Pour le savoir, des expériences de colocalisation d'HIP1R en immunofluorescence (IF) et d'immunoprécipitation (IP) ont été réalisées.

On sait que GFP-HIP1R FL peut se lier à l'actine (Engqvist-Goldstein et al., 1999), à la clathrine (Engqvist-Goldstein et al., 2001; Legendre-Guillemin et al., 2002), à la cortactine (Le Clainche et al., 2007), potentiellement à la tubuline (Hussain et al., 2003) et à Bcl-B (Kim et al., 2009). La liaison à la clathrine, à la tubuline et à l'actine a été testée par IP. Plusieurs tampons de lyse, protocoles et types de billes de protéines A-agarose ont été testés, et aucune IP sélective n'a été réussie avec la tubuline et l'actine. Nous sommes par contre parvenus à co-immunoprécipiter la clathrine avec la construction FL, sans avoir de clathrine avec le lysat contrôle (figure 14). On peut donc être assuré que notre construction FL permet bel et bien la liaison avec la clathrine.

Ce qui est ensuite possible de remarquer avec l'IF, c'est que la liaison avec l'actine n'est pas visible dans la partie de la cellule qui adhère à la lamelle (figure 8a). À cet endroit de la cellule, où la tension membranaire est plus élevée parce qu'en contact avec la lamelle (Boulant et al., 2011; Saffarian et al., 2009), GFP-HIP1R FL se présente sous la forme ponctuée, et non colocalisée sur le cytosquelette d'actine. Le même résultat a par contre été observé par Engvist-

Goldstein et al. en 1999, et est expliqué avec la théorie avancée par Wilbur et al. en 2008 qui dit que la liaison avec la clathrine est prédominante. Il est donc attendu qu'en interphase et à un endroit cellulaire où l'endocytose médiée par la clathrine ne nécessite pas le cytosquelette d'actine (Boulant et al., 2011), GFP-HIP1R FL ne soit pas colocalisé avec l'actine, mais plutôt avec les vésicules de clathrine et la cortactine.

Le marquage de l' $\alpha$ -tubuline (figure 12a) a aussi permis de déterminer que lors de l'interphase, HIP1R ne se lie pas à la tubuline. Il a par contre été démontré à la figure 12b, ainsi que par Park (2010) qu'HIP1R se retrouve sur les microtubules lors de la métaphase. Kaur et al. (2014) ont toutefois observé autre chose dans leur expérience : au contraire de cette expérience et de celle de Park (2010), ils ont plutôt observé que HIP1 se retrouve sur les microtubules lors de la métaphase et que HIP1R reste en périphérie de la cellule lors de la mitose. Cependant, il est vrai que l'image en IF qu'ils montrent dans leur article ne représente pas une cellule clairement en métaphase, comme pour HIP1. On voit que la CHC a la même répartition que lors de la métaphase, mais le noyau est beaucoup plus étalé, laissant penser que, soit il s'agit effectivement d'une cellule en métaphase mais avec une différente orientation (ayant pour résultat que les chromosomes paraissent plus étalés sur la plaque équatoriale), soit il s'agit plutôt d'une cellule en prométaphase et qu'alors, la comparaison avec nos résultats reste difficile.

La construction GFP-HIP1R  $\Delta$ ANTH a été conçue pour que la liaison avec les phospholipides membranaires (Ford et al., 2001) ne soit plus possible, et que si une liaison fonctionnelle avec la tubuline existe (Hussain et al., 2003), elle ne puisse pas non plus avoir lieu. Comme mentionné plus haut, une IP a été faite pour déterminer si la liaison avec la tubuline pouvait avoir lieu, sans succès. Ensuite, l'IF réalisée en faisant le marquage de l'actine et de la cortactine (figure 11b), montre que la répartition de cette construction est très semblable à celle de la construction complète (figure 11a). Ce qui est intéressant avec cette construction, c'est que la figure 12b indique que la liaison entre HIP1R et la tubuline n'est probablement pas directe, et ne se fait pas via le domaine ANTH. En effet, on peut voir dans cette figure que, comme il avait été montré précédemment, la CHC est bien localisée sur les microtubules lors de la métaphase (Royle, 2012), et que GFP-HIP1R  $\Delta$ A est aussi bien colocalisé avec les microtubules. Étant donné que la liaison avec la tubuline est exclue, deux autres choix s'imposent pour relier HIP1R avec les microtubules : via son domaine riche en proline (PRD) ou sa liaison avec la clathrine. Il a été montré que la dynamine, une GTPase importante lors de la scission des vésicules de l'EMC se retrouve colocalisée sur les microtubules lors de la métaphase, et que cette liaison est dépendante du domaine PRD de la dynamine (Ishida et al., 2011). Il se pourrait donc que le domaine PRD

d'HIP1R, situé dans sa partie C-terminale, lui permette également de lier la tubuline. De l'autre côté, il est aussi plausible que ce soit la clathrine qui permette à HIP1R de se lier aux microtubules, de façon directe, probablement via le site ELL d'HIP1R, ou de façon indirecte. En effet, il a été montré que SNX9 est nécessaire à ce que la CHC soit recrutée aux microtubules lors de la métaphase, mais que SNX9 ne se lie pas directement aux microtubules, nécessitant une protéine qui n'a pas encore été mise en évidence (Ma et al., 2013). Aussi, SNX9 possède un domaine SH3 qui peut se lier à des domaines PRD (Ma et al., 2013). Il est donc envisageable qu'une liaison SNX9/HIP1R se fasse et qu'HIP1R soit la protéine qui lie les microtubules à SNX9 et donc à la clathrine.

Ce qu'on remarque en premier avec la construction GFP-HIP1R  $\Delta$ AT en IF, c'est que la répartition de la protéine de fusion est beaucoup plus ponctuée que la construction complète (figure 8b versus figure 8a). Ceci est d'ailleurs le cas pour les autres constructions qui ne permettent théoriquement pas qu'HIP1R se lie avec l'actine (*i.e.* GFP-HIP1R  $\Delta$ L, figure 8c et GFP-HIP1R KVK/DDD, haut de la figure 8d), laissant donc penser que l'effet de ces trois mutations est le même sur les capacités de liaison d'HIP1R. Il est donc possible de penser que l'incapacité d'HIP1R de se lier à l'actine est responsable de cette nouvelle répartition. Étant donné que la seule liaison possible commune aux trois constructions (GFP-HIP1R  $\Delta$ AT, GFP-HIP1R  $\Delta$ L et GFP-HIP1R KVK/DDD) est celle avec la clathrine, il est envisageable que ces ponctuations soient des structures de clathrine, plus grosses que les vésicules classiques de l'endocytose. Il avait été démontré que de telles structures se formaient à la surface adhérente de cellules HeLa, et que ces structures, appelées «plaques de clathrine», étaient actine et dynamine dépendante (Saffarian et al., 2009). Étant donné qu'elles nécessitent l'actine pour être internalisées, et que les mutants d'HIP1R qui forment des structures plus grosses ne se lient pas à l'actine, il est plausible que les structures en question soient effectivement des plaques de clathrine qui sont incapables d'être internalisées, et qui pourraient même aller jusqu'à grossir et former les accumulations observées en figures 9 et 10, d'autant plus que ces structures montrent une colocalisation très marquée avec la CHC. Ces expériences d'IF laissent donc sous-entendre qu'HIP1R peut contribuer à l'internalisation des plaques de clathrine identifiées par Saffarian et ses collaborateurs, en 2009.

Cette construction d'HIP1R nous offre une autre information : ce ne serait pas le domaine PRD qui est responsable de la colocalisation d'HIP1R aux fuseaux mitotiques. La figure 13 semble effectivement montrer que même sans son domaine THATCH, HIP1R est concentrée sur

les fuseaux mitotiques, ou du moins les centrosomes. Évidemment, comme la qualité de la photo utilisée pour cette figure est faible, cette conclusion est loin d'être solide.

De son côté, la construction GFP-HIP1R  $\Delta$ L confirme que ce n'est effectivement pas la capacité d'HIP1R à se lier à l'actine, ni de se dimériser qui permet à HIP1R d'être positionnée sur les microtubules.

Finalement, la construction empêchant la liaison d'HIP1R avec la CLC en mutant son site de liaison (GFP-HIP1R ELL/AAA) montre de façon très claire que la mutation est efficace, et qu'il n'y a pas d'autres sites de liaison avec la clathrine (figure 14). Aussi, la répartition de la protéine de fusion en interphase (figure 11) montre une distribution beaucoup plus diffuse que pour la construction complète. On voit qu'on perd effectivement la colocalisation avec les vésicules de clathrine. Tout ceci reste en accord avec l'hypothèse voulant que qu'HIP1R participe à l'EMC soit via les vésicules de clathrine ou les plaques de clathrine.

Il aurait été particulièrement intéressant d'avoir une image d'une cellule en métaphase transfectée avec la construction GFP-HIP1R  $\Delta$ AT ou ELL/AAA avec un grossissement de 63 X. Ceci aurait pu permettre de tirer des conclusions plus solides à la question du domaine responsable de la liaison d'HIP1R aux microtubules : PRD dépendant ou clathrine dépendant. Les indices sont quand même plus nombreux à pointer vers la possibilité que ce soit clathrine dépendant.

#### **4.2 EFFET D'HIP1R SUR L'ENDOCYTOSE**

L'implication d'HIP1R dans l'endocytose se divise en deux aspects : elle favorise l'assemblage des vésicules de clathrine (Engqvist-Goldstein et al., 2001) et permet aux filaments d'actine d'être correctement polymérisés aux sites endocytiques (Engqvist-Goldstein et al., 2004; Le Clainche et al., 2007) et donc probablement de faciliter l'internalisation des vésicules de clathrine. Il a aussi longtemps été impliqué qu'HIP1R fait le lien entre les vésicules de clathrine et le cytosquelette d'actine, cependant un pont direct entre la clathrine et l'actine via HIP1R n'est pas probable : lorsqu'elle lie la clathrine, HIP1R a une conformation telle que la liaison avec l'actine est grandement diminuée (Wilbur et al., 2008).

Nous avons testé l'effet qu'une déplétion d'HIP1R avait sur la formation des structures anormales d'actine qui ont été observées par Engqvist-Goldstein et al. (2004) et par Le Clainche et al. (2007). Ces auteurs, issus du même groupe de recherche, ont noté que dans des cellules HeLa n'exprimant pas HIP1R, la plupart des cellules (Engqvist-Goldstein et al., 2004), ou plus de

60 % des cellules (Le Clainche et al., 2007) présentent ces structures, colocalisant également avec la cortactine. Ce que nous avons observé est très différent. Au plus, une moyenne de 21 % de nos cellules HeLa KD présentent ces structures (figure 17). Nous avons pu observer certains des types de structures considérés comme étant anormales par ces deux groupes dans nos cellules contrôles, nous laissant penser que leur phénotype anormal a pu être mal interprété. L'effet d'HIP1R sur l'organisation du cytosquelette d'actine semble donc beaucoup moins important que rapporté, mais quand même significatif ( $p = 0,001$ ). Aussi, il est à noter que Engqvist-Golstein et al. (2004) avaient testé trois siRNA différents. Nous avons utilisé leur deuxième siRNA, étant donné que c'était celui qui faisait le meilleur KD et qu'il n'avait pas d'incidence sur HIP1. Celui utilisé par Engqvist-Goldstein et al. (2004) est par contre le premier, celui des trois qui présente le moins bon taux de KD, et qui a un effet non négligeable sur l'expression d'HIP1. Il est donc possible que les effets notés par ces auteurs sur le cytosquelette d'actine ne soient pas dus exclusivement à la perte d'HIP1R mais à la perte combinée d'HIP1 et d'HIP1R, d'autant plus qu'il a été démontré que ces deux protéines pouvaient compenser la perte de l'autre (Hyun et al., 2004a). On obtient donc probablement un phénotype aggravé lorsque HIP1 et HIP1R sont en déficit. Finalement, le siRNA utilisé par Le Clainche et al. (2007) est plutôt le troisième, présentant un taux de KD intermédiaire entre le premier et le deuxième design, et un effet léger sur le taux d'expression d'HIP1.

Les résultats que nous avons par rapport à la restauration du phénotype normal suite à la transfection de l'ADN des différents mutants d'HIP1R ne sont pour l'instant qu'exploratoires : une seule expérience a pu être menée avec un nombre satisfaisant de cellules à la fois KD et GFP. Les données ont toutefois été combinées puisqu'il est attendu que si les cellules de trois expériences sont KD et reçoivent de l'ADN, elle doivent réagir de la même façon. Aucune de nos protéines de fusion GFP-HIP1R n'est parvenue à restaurer le phénotype mock. Ces résultats méritent tout de même d'être décortiqués : deux des trois expériences (exp. 2 et 3) n'ont pas été optimales. Malgré un taux de KD satisfaisant, le nombre de cellules transfectées avec l'ADN d'HIP1R est très bas, et le taux de survie de ces cellules est diminué. Il se pourrait alors que le phénotype observé dans ces deux expériences soit biaisé pas une quantité trop élevée de cellules mal en point. C'est pourquoi une attention particulière a été portée aux cellules de la première expérience, où le taux de KD, de transfection et de survie était meilleur. Dans cette expérience, la protéine complète restaure partiellement le phénotype. Aussi, deux autres constructions sont encore intermédiaires entre le phénotype KD et celui laissé par GFP-HIP1R FL : GFP-HIP1R  $\Delta A$  et  $\Delta L$ . De façon intéressante, la construction qui combine ces deux délétions, GFP-HIP1R  $\Delta AT$ ,

montre également un phénotype plus «grave» qu'avec les autres constructions, qui est vraiment très semblable à celui laissé par l'inhibition d'HIP1R.

On pourrait donc émettre l'hypothèse, évidemment sous toute réserve, que les domaines ANTH et Latch sont importants dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Il n'est pas étonnant que le domaine ANTH soit impliqué; c'est le domaine qui permet à HIP1R de se lier aux lipides membranaires (Hyun et al., 2004b), et il a été montré que c'est aux sites endocytiques (soit à la membrane plasmique) qu'HIP1R avait un rôle sur l'actine (Le Clainche et al., 2007). Il est aussi attendu que puisque le domaine Latch permet la liaison avec l'actine, il soit important pour le rôle d'HIP1R dans son organisation. Aussi, une chose est particulièrement intéressante avec la nécessité du domaine ANTH : ceci s'accorde très bien avec la théorie de Wilbur et al. (2008) voulant que la liaison simultanée entre l'actine et la clathrine soit improbable. On voit ici que c'est grâce au domaine ANTH qu'HIP1R peut agir sur l'actine, donc via sa liaison avec les phospholipides membranaires. Aussi, il n'y a pas d'effet de la construction ELL/AAA, confirmant également la théorie de Wilbur et al. (2008). En somme, pour pouvoir confirmer toutes ces théories, il faudrait être en mesure de reproduire ces résultats.

Nous avons aussi testé l'effet d'HIP1R sur l'internalisation de la transferrine, comme l'a fait Engqvist-Goldstein et al. en 2004. Ils ont quantifié l'internalisation de cette molécule suite au KD d'HIP1R avec le deuxième design de siRNA et n'ont trouvé qu'une légère différence (20% moins d'internalisation, au maximum) entre les HeLa mock et KD. Deux expériences ont été comptées avec un nombre variable de cellules dans chacune des conditions, mais toutes deux avec un bon taux de KD : 80 % pour la première et 90 % pour la deuxième. Dans les deux cas, il y a un effet significatif de la perte d'HIP1R sur la capacité des cellules HeLa à faire l'endocytose de la transferrine ( $p = 0,000$  dans la première expérience et  $p = 0,001$  dans la deuxième). Cet effet est par contre très changeant d'une expérience à l'autre : 4 % de différence vs 33%. Ce qui est intéressant, c'est que dans les deux cas, aucune construction d'HIP1R ne parvient non plus à restaurer le phénotype normal. Ceci laisse penser que la technique du KD comme telle a un impact sur l'endocytose, ou que l'effet observé est dû à une cumulation de cycles cellulaires sans la protéine cible (Royle, 2013), et que sa transfection transitoire ne parvient pas à restaurer le phénotype en 24 heures.

Le résultat de la première expérience, qu'HIP1R ait une incidence très modeste sur l'internalisation de la transferrine, était attendu. En effet, HIP1R semble surtout participer à l'internalisation des plaques de clathrine plutôt que des vésicules de clathrine classiques et ces plaques ne comptent au final que pour environ 11 % de l'internalisation cellulaire totale de la

transferrine (Saffarian et al., 2009). Ce chiffre est d'ailleurs assez en accord avec l'effet du KD d'HIP1R sur l'internalisation de la transferrine rapporté par Engqvist-Goldstein et al. en 2004. D'un autre côté, il se pourrait également que le récepteur de la transferrine ne soit pas le bon récepteur à mesurer pour vérifier l'effet d'HIP1R sur l'endocytose. Nous avons choisi de vérifier ce récepteur parce que c'est celui qui est généralement utilisé pour mesurer l'état de l'EMC. On pourrait peut-être observer des résultats différents en mesurant le taux d'internalisation des récepteurs tyrosine kinase, comme les récepteurs aux EGF (epidermal growth factor), étant donné qu'HIP1R a un rôle à jouer dans leur internalisation et leur recyclage (Hyun et al., 2004b).

### 4.3 EFFET D'HIP1R SUR LA MITOSE

On découvre que de plus en plus de protéines typiquement de l'endocytose ont également un rôle mitotique (Royle, 2011; Smith and Chircop, 2012). De plus, étant donné que l'EMC est probablement arrêtée dès les premières phases de la mitose (Fielding et al., 2012; Kaur et al., 2014), il est logique de constater que les principaux effecteurs de l'endocytose servent un autre but cellulaire. Il y a pour l'instant deux grands mécanismes qui expliquent bien ce qui permet à ces protéines de changer de rôle entre l'interphase et la mitose : une phosphorylation transitoire par des kinases mitotiques, ou un changement dans la tension membranaire entraînant une indisponibilité des certaines protéines (Chen et al., 1999; Floyd et al., 2001; Kaur et al., 2014; Royle, 2011). Puisqu'HIP1R a été impliquée dans le processus mitotique (Park, 2010), nous avons tenté de vérifier si elle était phosphorylée durant la mitose. Des cellules HeLa ont donc été synchronisées en mitose avec du nocodazole, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules. Plusieurs groupes de recherche utilisent du RO-3306 pour faire la synchronisation en mitose, mais étant donné que cette molécule est un inhibiteur de la cdk1 (Vassilev et al., 2006), et que cette molécule pourrait potentiellement être responsable de la phosphorylation d'HIP1R si phosphorylation il y a, nous avons préféré utiliser le nocodazole. Cette expérience a été répétée quelques fois, et aucun changement dans la masse moléculaire d'HIP1R n'a été remarqué (figure 19). Il avait pourtant été trouvé, suite à une analyse de protéomique qu'HIP1R ferait partie des protéines différemment phosphorylées entre l'interphase et la mitose (Dephoure et al., 2008), et que la protéine contient des sites potentiels de phosphorylation (PhosphoSitePlus, consulté en mai 2014). Il se pourrait donc qu'HIP1R soit effectivement phosphorylée, mais que les deux versions de la protéine apparaissent au même endroit en immunoblot. Pour vraiment vérifier si HIP1R se fait phosphoryler durant la mitose, il faudrait disposer d'un anticorps spécifique à la forme phosphorylée, ou bien utiliser un milieu de culture cellulaire contenant de l'ATP radioactif et vérifier si ce phosphore est incorporé à HIP1R lors de la mitose (Floyd et al., 2001).

Il reste quand même la possibilité qu'HIP1R ne soit pas phosphorylée pendant la mitose, mais que son rôle change à cause de l'augmentation mitotique de la tension membranaire. Étant donné que l'actine s'assure de garder la cellule mitotique ronde, elle ne peut plus participer à l'EMC, ce qui force cette dernière à arrêter (Kaur et al., 2014). Si l'EMC est arrêtée, et que l'actine ne se fait plus polymériser à partir des sites endocytiques, HIP1R est donc inutilisée, et aurait la possibilité de suivre la clathrine aux microtubules, ou d'y être recruté d'une autre façon, peut-être via son domaine PRD (voir section 4.1).

L'absence d'HIP1R provoque un retard dans la complétion de la mitose, et un mauvais alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale lors de la métaphase (Park, 2010). Nous avons donc fait une expérience où le KD d'HIP1R a été fait et où l'ADN des différents mutants d'HIP1R a été ensuite transfecté. Ces cellules ont été visualisées au microscope et la phase mitotique des cellules a été évaluée visuellement grâce à la forme du noyau. Comme l'a remarqué Park (2010) avant nous, le KD d'HIP1R provoque un ralentissement dans la progression de la mitose. Une plus grande proportion des cellules se retrouve en prophase chez les KD que chez les mock (figure 20). Ce que l'expérience de restauration nous a permis de constater, c'est que les constructions GFP-HIP1R FL et GFP-HIP1R  $\Delta$ L réagissent à peu près de la même façon (figure 20) : une bonne proportion des cellules restent en prophase, donc les constructions restaurent partiellement le phénotype normal, mais une beaucoup plus grande proportion des cellules sont passées à travers la métaphase et l'anaphase, pour rester probablement bloquées en télophase/cytocinèse. Ce nombre beaucoup plus élevé de cellules en télophase semble d'ailleurs être caractéristique des cellules ayant reçu le mélange de transfection (figures 20 et 21). C'est d'ailleurs une particularité qui a été observée lors de l'analyse du marquage de l' $\alpha$ -tubuline : beaucoup de cellules qui semblaient séparées et en interphase lorsque vues avec le marquage au DAPI ou avec la fluorescence de GFP-HIP1R étaient en fait encore attachées par le pont intercellulaire résiduel de la cytocinèse (observation non quantifiée). Il est donc probable que la technique de transfection en elle-même ait un effet sur la mitose des cellules HeLa.

Ensuite, la construction GFP-HIP1R  $\Delta$ AT n'a permis de trouver que huit cellules en mitose, mais la très grande majorité étaient aussi bloquées en prophase (figure 20). Il est toutefois difficile de statuer quoi que ce soit sur l'effet de cette construction sur la mitose, étant donné le nombre très réduit de cellules trouvées. L'effet du GFP-HIP1R ELL/AAA est par contre intéressant : le schéma de dispersion des cellules en mitose est très semblable à celui des cellules KD, laissant croire que la liaison d'HIP1R avec la clathrine est essentielle pour son rôle mitotique. Ceci est aussi en accord avec les résultats d'IF obtenus pointant vers le fait que ce

serait probablement via une liaison avec la clathrine qu'HIP1R puisse se lier aux fuseaux mitotiques. Finalement, un manque de temps nous empêche d'avoir les résultats ayant trait aux constructions GFP-HIP1R  $\Delta$ ANTH. En effet, cette expérience a dû être réalisée à Montréal, à l'IRCM. Nous avons donc un accès limité au microscope, et n'avons pu répéter l'acquisition de données. Aussi, les images ont été prises de façon automatique : nous ne pouvions donc pas localiser des cellules d'intérêt, puis effectuer un grossissement sur ces cellules, pour mieux décrire la localisation d'HIP1R.

Il est évident que cette expérience en est encore au stade exploratoire et qu'aucune conclusion solide ne peut être tirée pour l'instant. Non seulement l'expérience n'a été tentée qu'une fois, mais en plus, le nombre de cellules en mitose est très variable d'une construction à l'autre, empêchant de pouvoir réellement comparer l'effet des constructions entre elles. De plus, il est assez difficile de bien pouvoir distinguer les différentes phases de la mitose seulement par l'aspect du noyau, qui plus est avec un grossissement de seulement 20 X. Par exemple, les cellules en métaphase se séparant dans un plan X-Z plutôt que X-Y ont des chromosomes arrangés plus ou moins de la même façon qu'une cellule en prométaphase, donc de ne compter que les cellules ayant des chromosomes bien alignés est en fait une sous-estimation du nombre réel de cellules en métaphase et une surestimation du nombre de cellules en «prophase». Aussi, de n'utiliser que des critères de morphologie du noyau pour déterminer la phase de la mitose reste une méthode très subjective. La meilleure option serait d'utiliser plusieurs marqueurs de la mitose, comme un marquage de l' $\alpha$ -tubuline (fuseaux mitotiques) ou de la  $\gamma$ -tubuline (centrosomes), et de la phospho-histone H3 au lieu du DAPI. Ces marqueurs permettraient de repérer rapidement seulement les cellules en mitose et d'évaluer de façon plus objective la phase mitotique. Il faudrait également que le grossissement utilisé soit plus fort, toujours pour mieux distinguer les détails morphologiques. Les conclusions préliminaires que cette expérience a permis de tirer sont intéressantes et mériteraient d'être approfondies, d'autant plus que la technique de mise en culture et d'acquisition d'image permettent d'obtenir un nombre de cellules mitotiques transfectées plus grand.

#### **4.4 EFFET D'HIP1R SUR L'APOPTOSE**

Le troisième rôle cellulaire attribué à HIP1R est un rôle pro-apoptotique. Une équipe a montré que via ses domaines ANTH et THATCH, HIP1R pouvait se lier avec la protéine anti-apoptotique Bcl-B (ou BCL2L10) et induire l'apoptose, par l'activation de la caspase-9, et ce, avec le concours de BAK et non BAX (Kim et al., 2009).

On sait que Bcl-B est capable de se lier à BAX (Zhai et al., 2008), que pour être anti-apoptotique, Bcl-B doit être insérée dans la membrane externe de la mitochondrie (MEM) par son domaine C-terminal transmembranaire (Ke et al., 2001; Zhang et al., 2001), et que son domaine BH4 N-terminal est essentiel à la liaison BAX/Bcl-B et donc à l'inhibition de l'apoptose (Zhang et al., 2001). De plus, ce genre d'inhibition de l'apoptose est généralement due à l'insertion du domaine BH3 de la protéine pro-apoptotique (ici BAX) dans un domaine hydrophobe des protéines anti-apoptotiques (ici Bcl-B) (Westphal et al., 2011). Étant donné qu'HIP1R se lie à Bcl-B par, entre autre, le domaine THATCH, et que ce domaine contient une séquence BH3 (Hawley et al., 2012), il est concevable qu'HIP1R puisse altérer la liaison Bcl-B/BH3 (BAX) avec son propre domaine BH3. Il faut alors se demander pourquoi le domaine ANTH d'HIP1R est nécessaire à sa liaison avec Bcl-B.

Bcl-B est normalement ancrée dans la MEM (Ke et al., 2001; Zhang et al., 2001), pour que l'interaction HIP1R/Bcl-B se produise, il faudrait donc qu'HIP1R soit amenée à proximité de Bcl-B, donc aux mitochondries. On sait que le domaine ANTH se lie aux phosphatidylinositols (Ford et al., 2001; Hyun et al., 2004b), et que ces phospholipides sont présents dans la MEM (van Meer et al., 2008). On peut donc penser que HIP1R doit elle aussi être ancrée à la MEM pour pouvoir se lier à Bcl-B. Cette hypothèse est d'autant plus intéressante que l'interaction HIP1R/Bcl-B a été vérifiée par IP, donc dans des conditions où HIP1R pouvait avoir accès à la mitochondrie, plutôt qu'*in vitro*, par pulldown.

Nous avons donc tenté d'isoler des mitochondries provenant de cellules HEK293T qui avaient été transfectées avec GFP-HIP1R FL, GFP-HIP1R  $\Delta$ A et GFP-HIP1R  $\Delta$ AT, pour vérifier si on pouvait aussi isoler HIP1R. La figure 22a représente les résultats obtenus. Il y avait beaucoup de variation d'une expérience à l'autre sans qu'HIP1R ne soit drastiquement plus présent dans la fraction mitochondriale que cytosolique, ce qui nous a donné lieu de croire que les protocoles utilisés ne purifiaient pas efficacement les mitochondries mais isolaient également d'autres structures, comme les vésicules de clathrine. Pour vérifier cette hypothèse, des anticorps anti- $\alpha$ -adaptine ont été utilisés en plus des anticorps anti-COXIV pour montrer que les protocoles purifient des mitochondries, mais aussi des constituants des vésicules de clathrine (figure 22b). Ceci explique donc qu'HIP1R se retrouve dans la fraction «mitochondriale» et que l'ablation du domaine ANTH ne change pas ce résultat. On peut par contre penser que si HIP1R se retrouve effectivement dans les mitochondries, il y aurait eu un enrichissement de la protéine dans la fraction «mitochondriale» étant donné qu'elle contient des vésicules de clathrine et des mitochondries, or, ce n'est pas ce qui peut être observé à la figure 22a. On peut donc conclure

qu'en situation de surexpression, HIP1R ne se retrouve pas dans les mitochondries des cellules HEK293T. HIP1R se situe normalement dans le cortex cellulaire, en association avec la clathrine (Engqvist-Goldstein et al., 1999). Il est donc probable que pour que la protéine puisse faire un lien avec Bcl-B et ait un rôle pro-apoptotique, un changement quelconque se produise dans la structure d'HIP1R et que ses partenaires ou sa localisation cellulaire changent aussi. Les résultats par rapport à la localisation aux mitochondries seraient donc peut-être différents si les cellules étaient mises en situation d'apoptose. L'IP montrant la liaison entre Bcl-B et HIP1R a toutefois été faite sans que l'apoptose ne soit induite (Kim et al., 2009), ce qui laisse penser que la liaison entre les deux protéines se produit dans le contexte cellulaire normal, et que l'expérience que nous avons menée aurait dû montrer l'interaction avec les mitochondries si elle devait avoir lieu.

Il avait également été montré qu'une surexpression de Bcl-B seul n'induisait pas l'apoptose, mais qu'une surexpression d'HIP1R provoquait le clivage de la caspase-9, et que ce clivage était plus intense lorsque Bcl-B était ajouté au système expérimental (Kim et al., 2009). On peut donc conclure que c'est la liaison entre HIP1R et Bcl-B qui induit l'apoptose, et que, si on enlève les domaines ANTH et/ou THATCH, cet effet est annulé. Nous avons donc tenté de reproduire cette expérience pour confirmer que ce sont bien les domaines ANTH et THATCH qui permettent à HIP1R d'avoir un rôle pro-apoptotique.

Le KD d'HIP1R avait donc été fait et GFP-HIP1R FL, GFP-HIP1R  $\Delta$ A, et GFP-HIP1R  $\Delta$ AT ont été transfectés dans des cellules HEK293T en premier lieu pour voir si la construction complète induisait le clivage de la caspase-9 et en second lieu, si les délétions annulaient cet effet. Comme il est possible d'observer à la figure 23, le KD d'HIP1R semble avoir un effet sur la quantité de caspase-9 clivée. Ceci voudrait donc dire que ce n'est pas seulement la surexpression artificielle d'HIP1R qui induit l'apoptose. Ensuite, les mutants d'HIP1R provoquent moins d'apoptose que la construction complète, ce qui confirme qu'au moins le domaine ANTH est nécessaire au rôle apoptotique d'HIP1R. Ce qui est par contre surprenant, c'est que la délétion de seulement le domaine ANTH provoque une baisse dans la quantité de caspase-9 clivée, alors que cette construction permet à HIP1R de conserver la liaison avec Bcl-B (Kim et al., 2009). Nous avons rencontré plusieurs difficultés lors de la mise au point de cette expérience et la variation des résultats d'une expérience à l'autre a fait en sorte que nous avons décidé d'opter pour une technique nécessitant beaucoup moins de protéines pour voir un effet sur l'activation des caspases. Nous avons donc utilisé un kit contenant un substrat de la caspase-3, caspase située en aval de la caspase-9 dans la cascade protéique de l'induction de l'apoptose (Alberts et al., 2008), couplée à une molécule devenant fluorescente lorsque libérée après clivage par la caspase.

Les résultats de cette expérience (figure 24) montrent très clairement que la surexpression d'HIP1R dans le modèle cellulaire HEK293T (le même qu'utilisé par Kim et al. en 2009) ne provoque pas d'activation de la caspase-3. Ce résultat montre que si HIP1R a en effet la faculté d'induire l'apoptose, cette stimulation est très faible puisqu'elle n'a pas d'incidence sur une des caspases bourreau rendant l'apoptose inévitable. Il est cependant vrai que dans l'article de 2009, Kim et ses collaborateurs ont montré que c'est en procédant à la surexpression combinée de Bcl-B que HIP1R parvenait à induire le clivage de la caspase-3. Il aurait sans doute alors été préférable d'utiliser un kit contenant un substrat de la caspase-9 plutôt que pour la caspase-3, ou alors ajouter Bcl-B dans les essais de caspase-3.

L'implication d'HIP1R dans l'apoptose reste très modeste et l'étude de Kim et de ses collaborateurs (2009) soulève plus de questions qu'elle n'amène de réponse. Une autre étude a montré que Bcl-X<sub>L</sub>, un des membres de la famille des protéines à domaine BH3 avait un rôle dans l'internalisation des vésicules endocytiques dans des cellules de l'hippocampe (Li et al., 2013), il n'est donc pas à exclure que Bcl-B aurait plutôt un rôle endocytique. Il serait donc intéressant de vérifier l'effet d'un KD de Bcl-B sur l'organisation du cytosquelette d'actine, ou sur l'internalisation d'une molécule, comme l'EGFR. On pourrait aussi vérifier si Bcl-B module l'internalisation des plaques de clathrine. La caractérisation de l'interaction entre Bcl-B et HIP1R apporterait probablement beaucoup de réponses quant à la fonction de l'interaction : on pourrait savoir quel domaine fonctionnel de Bcl-B est impliqué, et si cette liaison en empêche une autre. En effet, puisque que le domaine BH3 d'HIP1R se trouve à une distance d'environ 25 acides aminés du site de liaison avec l'actine, il est envisageable que cette interaction ait des répercussions sur le rôle d'HIP1R dans l'organisation de l'actine.

## CHAPITRE 5

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de maîtrise avait comme objectif de mieux comprendre la dynamique cellulaire de la protéine HIP1R en empêchant l'expression endogène de la protéine et en la remplaçant par des mutants comportant soit des délétions de domaines fonctionnels, soit des mutations ponctuelles empêchant la liaison avec un partenaire clé.

Des protéines de fusion GFP ont d'abord dû être produites par clonage moléculaire. Ces constructions sont GFP-HIP1R FL, GFP-HIP1R  $\Delta$ ANTH, GFP-HIP1R  $\Delta$ ANTH $\Delta$ THATCH, GFP-HIP1R  $\Delta$ Latch, GFP-HIP1R <sup>463</sup>ELL/AAA et GFP-HIP1R <sup>922</sup>KVK/DDD. En faisant la transfection transitoire de ces constructions à l'intérieur d'un modèle cellulaire HeLa, nous avons pu déterminer que le site <sup>463</sup>ELL sur HIP1R est effectivement le seul à permettre la liaison avec la clathrine et que la mutation <sup>463</sup>AAA l'empêche de façon efficace. Nous avons aussi pu montrer qu'il n'y a probablement pas d'interaction entre la tubuline et HIP1R lors de l'interphase, et ce malgré que le domaine ANTH puisse théoriquement lier la tubuline (Hussain et al., 2003).

Ensuite, nous avons pu constater que toutes les constructions empêchant théoriquement la liaison avec l'actine, soient GFP-HIP1R  $\Delta$ ANTH $\Delta$ THATCH, GFP-HIP1R  $\Delta$ Latch, et GFP-HIP1R <sup>922</sup>KVK/DDD provoquent toutes des structures colocalisant avec la clathrine, et qui s'accordent bien avec la description des plaques de clathrine décrites par Saffarian et ses collaborateurs en 2009. Ceci expliquerait bien pourquoi l'effet d'HIP1R sur l'endocytose de la transferrine est si faible. Nous avons aussi avancé l'idée que pour qu'HIP1R puisse avoir un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine, les domaines ANTH et Latch étaient importants : le premier pour probablement positionner HIP1R aux sites endocytiques et le deuxième se liant à l'actine. Ceci confirmerait le fait qu'HIP1R ne peut pas interagir avec la clathrine et l'actine en même temps (Wilbur et al., 2008), puisque c'est le domaine ANTH et non le site <sup>463</sup>ELL qui est important pour relier l'actine aux sites endocytiques.

Les expériences d'immunofluorescence nous ont également permis de confirmer qu'HIP1R se retrouvait bel et bien sur les fuseaux mitotiques lors de la métaphase, et que cette liaison était indépendante de l'interaction d'HIP1R avec l'actine ou de la présence de son domaine ANTH. Il est donc très probable que la localisation aux microtubules se fasse soit via une interaction directe avec la clathrine par le site <sup>463</sup>ELL, soit via son domaine PRD et une

interaction directe avec la tubuline, comme c'est le cas avec la dynamine (Ishida et al., 2011). L'expérience de KD et de restauration avec les mutants a aussi confirmé l'hypothèse selon laquelle ce serait la liaison avec la clathrine qui donnerait à HIP1R un rôle mitotique.

Nous avons vu que la déplétion d'HIP1R avait un effet significatif sur l'endocytose, en créant une désorganisation du cytosquelette d'actine, et en empêchant l'internalisation de la transferrine.

Finalement, nous avons montré qu'une surexpression de seulement HIP1R n'induisait pas l'apoptose par activation de la caspase-3, mais qu'un KD d'HIP1R pourrait avoir un effet sur le clivage de la caspase-9.

Cet ambitieux projet a donc permis de mieux définir et comprendre plusieurs rôles cellulaires d'HIP1R. Certains points restent par contre encore à être éclaircis. Nous avons tout d'abord très peu d'informations concernant la construction GFP-HIP1R KVK/DDD étant donné que c'est la construction qui a mis le plus de temps à être clonée. Elle permettrait pourtant de bien pouvoir départager les effets dus au manque de l'interaction avec l'actine, avec HIP1R elle-même, avec la cortactine, ou à la présence du domaine BH3 potentiel.

Le gros du travail concernant l'apoptose reste encore à faire. L'effet d'HIP1R sur l'activation des caspases est très nébuleux, on ne sait pas quel est le domaine de Bcl-B qui est responsable de l'interaction avec HIP1R et il serait très intéressant de savoir si ce domaine est le domaine BH4 de Bcl-B : on aurait ainsi une confirmation que le rôle de l'interaction HIP1R/Bcl-B est apoptotique et non endocytique. Il a aussi été montré qu'HIP1R accroissait l'interaction entre Bcl-B et la caspase-9, sans qu'HIP1R ne puisse se lier à la caspase-9, ni à Apaf-1, un autre constituant de l'apoptosome (Kim et al., 2009). On sait pourtant que l'homologue murin de Bcl-B (Boo/Diva) a la capacité de se lier avec Apaf-1 (Song et al., 1999) et qu'HIP1 peut activer la caspase-9 et aussi interagir avec Apaf-1 (Choi et al., 2006). L'implication d'HIP1R dans l'apoptosome est donc plausible, et mériterait d'être investiguée. Il faudrait également vérifier comment HIP1R module l'apoptose induite par la protéine BAK, comme l'ont avancé Kim et al. en 2009. On pourrait vérifier si HIP1R active BAK directement ou indirectement, en empêchant l'inhibition de BAK par une protéine anti-apoptotique, comme Bcl-B.

Concernant les rôles endocytiques d'HIP1R, il faudrait en premier lieu réussir à répéter les expériences de KD et de restauration pour réellement quantifier l'effet d'HIP1R sur l'internalisation de récepteurs et l'organisation du cytosquelette. Il faudrait également vérifier l'effet d'HIP1R sur un autre récepteur que celui de la transferrine, comme les récepteurs à EGF

(Hyun et al., 2004b). Il faudrait aussi déterminer si les structures observées avec les mutants empêchant la liaison avec l'actine sont effectivement dues au blocage dans l'internalisation des plaques de clathrine. Il faudrait alors bien séparer le rôle d'HIP1R dans l'endocytose des vésicules versus des plaques de clathrine. Étant donné l'implication d'HIP1R dans l'organisation du cytosquelette d'actine via son interaction avec la cortactine, il serait pertinent de tester l'effet d'une construction empêchant cette interaction.

Finalement, le rôle d'HIP1R dans la mitose est vraiment intéressant et peu défini. Il faudrait en premier lieu parvenir à déterminer avec certitude ce qui permet à HIP1R de changer de rôle. Est-ce dû à une phosphorylation par une kinase mitotique ou plutôt à la simple disponibilité de la protéine dû au fait que l'actine est, quant à elle, uniquement disponible à maintenir la tension membranaire (Kaur et al., 2014)? Aussi, il faudrait déterminer si c'est le domaine PRD ou le site <sup>463</sup>ELL qui permet à HIP1R d'être localisée aux fuseaux mitotiques et déterminer aussi si HIP1R a un rôle à jouer dans les ponts reliant les microtubules entre eux. Nous avons également pu constater que le KD d'HIP1R provoquait un ralentissement dans la croissance cellulaire des cellules HeLa (observation non quantifiée). Il faudrait déterminer si cet effet est dû à un blocage dans le passage de la prophase à la métaphase, ou à un défaut endocytique.

Étant donné que la technique du KD est lente à être efficace (96h pour HIP1R), il serait pertinent d'opter pour la technique du knock-sideways, qui permet une relocalisation de la protéine cible en quelques minutes, permettant d'observer le phénotype causé par l'absence de la protéine en question, de façon beaucoup plus juste (Cheeseman et al., 2013). Sinon, puisque la double transfection occasionne beaucoup de dommages pour les cellules traitées, il pourrait être pertinent d'utiliser la technique de «genome editing» à l'aide du système CRISPR/Cas9. Cette technique pourrait permettre de modifier le gène d'HIP1R pour apporter les mutations à l'étude tout en ayant un niveau d'expression de ces protéines mutées qui soit normal (Zhang et al., 2014). Le phénotype que présenteraient ces cellules serait alors beaucoup plus réaliste de l'effet de chacune des mutations sur les fonctions d'HIP1R.

Le travail à faire pour vraiment comprendre les rôles cellulaires d'HIP1R est encore vaste, mais quelques précisions ont quand même pu être apportées grâce à ce projet de recherche.



## RÉFÉRENCES

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Walter, P. 2008. Molecular biology of the cell, fifth edition. Garland science (New York), p.787-799, 973-975, 1170
- Banerjee, M., Datta, M., Majumder, P., Mukhopadhyay, D., and Bhattacharyya, N.P. (2010). Transcription regulation of caspase-1 by R393 of HIPPI and its molecular partner HIP-1. *Nucleic Acids Research* 38, 878-892.
- Booth, D.G., Hood, F.E., Prior, I.A., and Royle, S.J. (2011). A TACC3/ch-TOG/clathrin complex stabilises kinetochore fibres by inter-microtubule bridging. *Embo Journal* 30, 906-919.
- Boucrot, E., and Kirchhausen, T. (2007). Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 7939-7944.
- Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J.-C., Ubelmann, F., and Kirchhausen, T. (2011). Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nature Cell Biology* 13, 1124-1131.
- Brett, T.J., Legendre-Guillemain, V., McPherson, P.S., and Fremont, D.H. (2006). Structural definition of the F-actin-binding THATCH domain from HIP1R. *Nat Struct Mol Biol* 13, 121-130.
- Carreno, S., Engqvist-Goldstein, A.E, Zhang, C.X., McDonald, K.L., and Drubin, D.G. (2004). Actin dynamics coupled to clathrin-coated vesicle formation at the trans-Golgi network. *The Journal of Cell Biology* 165, 781-788.
- Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.
- Cayrol, C., Cougoule, C., and Wright, M. (2002). The beta 2-adaptin clathrin adaptor interacts with the mitotic checkpoint kinase BubR1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298, 720-730.
- Cheeseman, L.P., Harry, E.F., McAinsh, A.D., Prior, I.A., and Royle, S.J. (2013). Specific removal of TACC3-ch-TOG-clathrin at metaphase deregulates kinetochore fiber tension. *Journal of Cell Science* 126, 2102-2113.
- Chen, H., Slepnev, V.I., Di Fiore, P.P., and De Camilli, P. (1999). The interaction of epsin and Eps15 with the clathrin adaptor AP-2 is inhibited by mitotic phosphorylation and enhanced by stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *Journal of Biological Chemistry* 274, 3257-3260.
- Chircop, M., Sarcevic, B., Larsen, M.R., Malladi, C.S., Chau, N., Zavortink, M., Smith, C.M., Quan, A., Anggono, V., Hains, P.G., *et al.* (2011). Phosphorylation of dynamin II at serine-764 is associated with cytokinesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813, 1689-1699.
- Choi, S.A., Kim, S.J., and Chung, K.C. (2006). Huntingtin-interacting protein 1-mediated neuronal cell death occurs through intrinsic apoptotic pathways and mitochondrial alterations. *FEBS Letters* 580, 5275-5282.
- Chopra, V.S., Metzler, M., Rasper, D.M., Engqvist-Goldstein, A.E.Y., Singaraja, R., Gan, L., Fichter, K.M., McCutcheon, K., Drubin, D., Nicholson, D.W., *et al.* (2000). HIP12 is a non-proapoptotic member of a gene family including HIP1, an interacting protein with huntingtin. *Mammalian Genome* 11, 1006-1015.
- Dao, V.T., Dupuy, A.G., Gavet, O., Caron, E., and de Gunzburg, J. (2009). Dynamic changes in Rap1 activity are required for cell retraction and spreading during mitosis. *Journal of Cell Science* 122, 2996-3004.
- Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., and Gygi, S.P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10762-10767.
- Engqvist-Goldstein, Å.E.Y., Kessels, M.M., Chopra, V.S., Hayden, M.R., and Drubin, D.G. (1999). An Actin-Binding Protein of the Sla2/Huntingtin Interacting Protein 1 Family Is a

- Novel Component of Clathrin-Coated Pits and Vesicles. *The Journal of Cell Biology* *147*, 1503-1518.
- Engqvist-Goldstein, Å.E.Y., Warren, R.A., Kessels, M.M., Keen, J.H., Heuser, J., and Drubin, D.G. (2001). The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly in vitro. *The Journal of Cell Biology* *154*, 1209-1224.
- Engqvist-Goldstein, Å.E.Y., Zhang, C.X., Carreno, S., Barroso, C., Heuser, J.E., and Drubin, D.G. (2004). RNAi-mediated Hip1R Silencing Results in Stable Association between the Endocytic Machinery and the Actin Assembly Machinery. *Molecular Biology of the Cell* *15*, 1666-1679.
- Fielding, A., and Royle, S. (2013). Mitotic inhibition of clathrin-mediated endocytosis. *Cell Mol Life Sci*, 1-11.
- Fielding, A.B., Willox, A.K., Okeke, E., and Royle, S.J. (2012). Clathrin-mediated endocytosis is inhibited during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 6572-6577.
- Floyd, S.R., Porro, E.B., Slepnev, V.I., Ochoa, G.C., Tsai, L.H., and De Camilli, P. (2001). Amphiphysin 1 binds the cyclin-dependent kinase (cdk) 5 regulatory subunit p35 and is phosphorylated by cdk5 and cdc2. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 8104-8110.
- Foraker, A.B., Camus, S.M., Evans, T.M., Majeed, S.R., Chen, C.Y., Taner, S.B., Correa, I.R., Doxsey, S.J., and Brodsky, F.M. (2012). Clathrin promotes centrosome integrity in early mitosis through stabilization of centrosomal ch-TOG. *Journal of Cell Biology* *198*, 591-605.
- Ford, M.G.J., Pearse, B.M.F., Higgins, M.K., Vallis, Y., Owen, D.J., Gibson, A., Hopkins, C.R., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2001). Simultaneous Binding of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and Clathrin by AP180 in the Nucleation of Clathrin Lattices on Membranes. *Science* *291*, 1051-1055.
- Gervais, F.G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Metzler, M., Hackam, A.S., Tam, J., Vaillancourt, J.P., Houtzager, V., *et al.* (2002). Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partners Hipp1. *Nature Cell Biology* *4*, 95-105.
- Grimm-Günter, E.-M.S., Milbrandt, M., Merkl, B., Paulsson, M., and Plomann, M. (2008). PACSIN proteins bind tubulin and promote microtubule assembly. *Experimental Cell Research* *314*, 1991-2003.
- Hackam, A.S., Yassa, A.S., Singaraja, R., Metzler, M., Gutekunst, C.A., Gan, L., Warby, S., Wellington, C.L., Vaillancourt, J., Chen, N.S., *et al.* (2000). Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 41299-41308.
- Hawley, R.G., Yuzhong, C., Riz, I., and Chen, Z. (2012). An Integrated Bioinformatics and Computational Biology Approach Identifies New BH3-Only Protein Candidates. *Open Biology Journal* *5*, 6-16.
- Hussain, N.K., Yamabhai, M., Bhakar, A.L., Metzler, M., Ferguson, S.S.G., Hayden, M.R., McPherson, P.S., and Kay, B.K. (2003). A Role for Epsin N-terminal Homology/AP180 N-terminal Homology (ENTH/ANTH) Domains in Tubulin Binding. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 28823-28830.
- Hyun, T.S., Li, L., Oravec-Wilson, K.I., Bradley, S.V., Provot, M.M., Munaco, A.J., Mizukami, I.F., Sun, H.S., and Ross, T.S. (2004a). Hip1-related mutant mice grow and develop normally but have accelerated spinal abnormalities and dwarfism in the absence of HIP1. *Molecular and Cellular Biology* *24*, 4329-4340.
- Hyun, T.S., Rao, D.S., Saint-Dic, D., Michael, L.E., Kumar, P.D., Bradley, S.V., Mizukami, I.F., Oravec-Wilson, K.I., and Ross, T.S. (2004b). HIP1 and HIP1r Stabilize Receptor

- Tyrosine Kinases and Bind 3-Phosphoinositides via Epsin N-terminal Homology Domains. *Journal of Biological Chemistry* 279, 14294-14306.
- Ishida, N., Nakamura, Y., Tanabe, K., Li, S.A., and Takei, K. (2011). Dynamin 2 Associates with Microtubules at Mitosis and Regulates Cell Cycle Progression. *Cell Structure and Function* 36, 145-154.
- John, M., Briand, J.P., Granger-Schnarr, M., and Schnarr, M. (1994). Two pairs of oppositely charged amino acids from Jun and Fos confer heterodimerization to GCN4 leucine zipper. *Journal of Biological Chemistry* 269, 16247-16253.
- Kalchman, M.A., Koide, H.B., McCutcheon, K., Graham, R.K., Nichol, K., Nishiyama, K., Kazemi-Esfarjani, P., Lynn, F.C., Wellington, C., Metzler, M., *et al.* (1997). HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nat Genet* 16, 44-53.
- Kaur, S., Fielding, A.B., Gassner, G., Carter, N.J., and Royle, S.J. (2014). An unmet actin requirement explains the mitotic inhibition of clathrin-mediated endocytosis. *eLife* 3.
- Ke, N., Godzik, A., and Reed, J.C. (2001). Bcl-B, a Novel Bcl-2 Family Member That Differentially Binds and Regulates Bax and Bak. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12481-12484.
- Kim, J.H., Yoon, S., Won, M., Sim, S.H., Ko, J.J., Han, S.H., Lee, K.A., Lee, K., and Bae, J. (2009). HIP1R Interacts with a Member of Bcl-2 Family, BCL2L10, and Induces BAK-dependent Cell Death. *Cellular Physiology and Biochemistry* 23, 043-052.
- Krajewska, M., Mai, J.K., Zapata, J.M., Ashwell, K.W.S., Schendel, S.L., Reed, J.C., and Krajewski, S. (2002). Dynamics of expression of apoptosis-regulatory proteins Bid, Bcl-2, Bcl-X, Bax and Bak during development of murine nervous system. *Cell Death Differ* 9, 145-157.
- The human protein atlas, <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000130787/tissue>, site consulté en mai 2014.
- Le Clainche, C., Pauly, B.S., Zhang, C.X., Engqvist-Goldstein, A.E.Y., Cunningham, K., and Drubin, D.G. (2007). A Hip1R-cortactin complex negatively regulates actin assembly associated with endocytosis. *EMBO J* 26, 1199-1210.
- Legendre-Guillemain, V., Metzler, M., Charbonneau, M., Gan, L., Chopra, V., Philie, J., Hayden, M.R., and McPherson, P.S. (2002). HIP1 and HIP12 Display Differential Binding to F-actin, AP2, and Clathrin. *Journal of Biological Chemistry* 277, 19897-19904.
- Legendre-Guillemain, V., Metzler, M., Lemaire, J.-F., Philie, J., Gan, L., Hayden, M.R., and McPherson, P.S. (2005). Huntingtin Interacting Protein 1 (HIP1) Regulates Clathrin Assembly through Direct Binding to the Regulatory Region of the Clathrin Light Chain. *Journal of Biological Chemistry* 280, 6101-6108.
- Lehtonen, S., Shah, M., Nielsen, R., Iino, N., Ryan, J.J., Zhou, H.L., and Farquhar, M.G. (2008). The endocytic adaptor protein ARH associates with motor and centrosomal proteins and is involved in centrosome assembly and cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell* 19, 2949-2961.
- Li, H., Alavian, K.N., Lazrove, E., Mehta, N., Jones, A., Zhang, P., Licznarski, P., Graham, M., Uo, T., and Guo, J. (2013). A Bcl-xL-Drp1 complex regulates synaptic vesicle membrane dynamics during endocytosis. *Nature Cell Biology* 15, 773-785.
- Liu, Z.H., and Zheng, Y.X. (2009). A requirement for epsin in mitotic membrane and spindle organization. *Journal of Cell Biology* 186, 473-480.
- Ma, M.P.C., and Chircop, M. (2012). SNX9, SNX18 and SNX33 are required for progression through and completion of mitosis. *Journal of Cell Science* 125, 4372-4382.
- Ma, M.P.C., Robinson, P.J., and Chircop, M. (2013). Sorting Nexin 9 Recruits Clathrin Heavy Chain to the Mitotic Spindle for Chromosome Alignment and Segregation. *PLoS ONE* 8, 1-1.

- Matthews, H.K., Delabre, U., Rohn, J.L., Guck, J., Kunda, P., and Baum, B. (2012). Changes in Ect2 Localization Couple Actomyosin-Dependent Cell Shape Changes to Mitotic Progression. *Dev Cell* 23, 371-383.
- McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 517-533.
- McPherson, P.S. (2010). Proteomic analysis of clathrin-coated vesicles. *PROTEOMICS* 10, 4025-4039.
- Merrifield, C.J., Feldman, M.E., Wan, L., and Almers, W. (2002). Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol* 4, 691-698.
- Merrifield, C.J., Qualmann, B., Kessels, M.M., and Almers, W. (2004). Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *European Journal of Cell Biology* 83, 13-18.
- Metzler, M., Legendre-Guillemain, V., Gan, L., Chopra, V., Kwok, A., McPherson, P.S., and Hayden, M.R. (2001). HIP1 Functions in Clathrin-mediated Endocytosis through Binding to Clathrin and Adaptor Protein 2. *Journal of Biological Chemistry* 276, 39271-39276.
- Park, S.J. (2010). Huntingtin-interacting protein 1-related is required for accurate congression and segregation of chromosomes. *BMB Rep* 43, 795-800.
- Pearlman, J.A., Powaser, P.A., Elledge, S.J., and Caskey, C.T. (1994). Troponin T is capable of binding dystrophin via a leucine zipper. *FEBS Letters* 354, 183-186.
- PhosphoSitePlus de Cell signaling technology. 2003-20013. HIP1R (human) [en ligne]. Disponible à l'adresse suivante: <http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=18708&showAllSites=true>, [cité en mai 2014].
- Ramanan, V., Agrawal, N.J., Liu, J., Engles, S., Toy, R., and Radhakrishnan, R. (2011). Systems biology and physical biology of clathrin-mediated endocytosis. *Integrative Biology* 3.
- Rao, Y., Rückert, C., Saenger, W., and Haucke, V. (2012). The early steps of endocytosis: From cargo selection to membrane deformation. *European Journal of Cell Biology* 91, 226-233.
- Royle, S.J. (2011). Mitotic Moonlighting Functions for Membrane Trafficking Proteins. *Traffic* 12, 791-798.
- Royle, S.J. (2012). The role of clathrin in mitotic spindle organisation. *Journal of Cell Science* 125, 19-28.
- Royle, S.J. (2013). Protein adaptation: mitotic functions for membrane trafficking proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 592-599.
- Royle, S.J., Bright, N.A., and Lagnado, L. (2005). Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature* 434, 1152-1157.
- Royle, S.J., and Lagnado, L. (2006). Trimerisation is important for the function of clathrin at the mitotic spindle. *Journal of Cell Science* 119, 4071-4078.
- Saffarian, S., Cocucci, E., and Kirchhausen, T. (2009). Distinct Dynamics of Endocytic Clathrin-Coated Pits and Coated Plaques. *PLoS Biol* 7, e1000191.
- Seki, N., Muramatsu, M.-a., Sugano, S., Suzuki, Y., Nakagawara, A., Ohhira, M., Hayashi, A., Hori, T.-a., and Saito, T. (1998). Cloning, expression analysis, and chromosomal localization of <i>HIP1R</i>, an isolog of huntingtin interacting protein (HIP1). *Journal of Human Genetics* 43, 268-271.
- Shimizu, H., Nagamori, I., Yabuta, N., and Nojima, H. (2009). GAK, a regulator of clathrin-mediated membrane traffic, also controls centrosome integrity and chromosome congression. *Journal of Cell Science* 122, 3145-3152.
- Smith, C.M., and Chircop, M. (2012). Clathrin-Mediated Endocytic Proteins are Involved in Regulating Mitotic Progression and Completion. *Traffic* 13, 1628-1641.
- Song, Q., Kuang, Y., Dixit, V.M., and Vincenz, C. (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J* 18, 167-178.

- Stewart, M.P., Helenius, J., Toyoda, Y., Ramanathan, S.P., Muller, D.J., and Hyman, A.A. (2011). Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature* *469*, 226-230.
- Tacheva-Grigorova, S.K., Santos, A.J.M., Boucrot, E., and Kirchhausen, T. (2013). Clathrin-Mediated Endocytosis Persists during Unperturbed Mitosis. *Cell Reports* *4*, 659-668.
- Taylor, S.S., Ha, E., and McKeon, F. (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *Journal of Cell Biology* *142*, 1-11.
- Thompson, H.M., Skop, A.R., Euteneuer, U., Meyer, B.J., and McNiven, M.A. (2002). The Large GTPase Dynamin Associates with the Spindle Midzone and Is Required for Cytokinesis. *Current Biology* *12*, 2111-2117.
- van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *9*, 112-124.
- Vassilev, L.T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., Heimbrook, D.C., and Chen, L. (2006). Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 10660-10665.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., and Kluck, R.M. (2011). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1813*, 521-531.
- Wilbur, J.D., Chen, C.-Y., Manalo, V., Hwang, P.K., Fletterick, R.J., and Brodsky, F.M. (2008). Actin Binding by Hip1 (Huntingtin-interacting Protein 1) and Hip1R (Hip1-related Protein) Is Regulated by Clathrin Light Chain. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 32870-32879.
- Zhai, D.Y., Jin, C.F., Huang, Z.W., Satterthwait, A.C., and Reed, J.C. (2008). Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 9580-9586.
- Zhang, F., Wen, Y., and Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*.
- Zhang, H., Holzgreve, W., and De Geyter, C. (2001). Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. *Human Molecular Genetics* *10*, 2329-2339.



## ANNEXE : DONNÉES BRUTES

**Tableau 5 : Nombres de cellules HeLa comptées dans l'expérience 1 de KD-restauration et observation d'un cytosquelette d'actine normal ou anormal.**

	normale	anormales	total	% anormales	moyenne anormales
<b>Mock</b>	375	40	415	9,6	10,0
	383	44	427	10,3	
<b>KD</b>	350	88	438	20,1	24,8
	288	120	408	29,4	
<b>GFP-HIP1R FL</b>	347	52	399	13,0	10,3
	366	30	396	7,6	
<b>GFP-HIP1R <math>\Delta</math>A</b>	305	40	345	11,6	15,3
	315	74	389	19,0	
<b>GFP-HIP1R <math>\Delta</math>AT</b>	272	127	399	31,8	26,9
	255	72	327	22,0	
<b>GFP-HIP1R <math>\Delta</math>L</b>	304	99	403	24,6	18,1
	364	48	412	11,7	
<b>GFP-HIP1R ELL/AAA</b>	350	57	407	14,0	13,5
	346	52	398	13,1	

**Tableau 6 : Nombres de cellules HeLa comptées dans l'expérience 2 de KD-restauration et observation d'un cytosquelette d'actine normal ou anormal.**

	normales	anormales	total	% anormales	moyenne anormales
<b>Mock</b>	378	24	402	6,0	7,0
	369	32	401	8,0	
<b>KD</b>	149	23	172	13,4	13,4
	181	28	209	13,4	
<b>GFP-HIP1R FL</b>	91	29	120	24,2	25,7
	24	9	33	27,3	
<b>GFP-HIP1R <math>\Delta</math>A</b>	46	7	53	13,2	14,6
	42	8	50	16,0	
<b>GFP-HIP1R <math>\Delta</math>AT</b>	16	8	24	33,3	30,1
	93	34	127	26,8	
<b>GFP-HIP1R <math>\Delta</math>L</b>	32	16	48	33,3	36,7
	81	54	135	40,0	
<b>GFP-HIP1R ELL/AAA</b>	36	42	78	53,8	57,7
	5	8	13	61,5	
<b>GFP-HIP1R KVK/DDD</b>	23	11	34	32,4	48,6
	13	24	37	64,9	
<b>GFP</b>	10	23	33	69,7	71,7
	5	14	19	73,7	

**Tableau 7 : Nombres de cellules HeLa comptées dans l'expérience 3 de KD-restauration et observation d'un cytosquelette d'actine normal ou anormal.**

	normales	anormales	total	% anormales	moyenne anormales
<b>Mock</b>	384	15	399	3,8	4,6
	350	20	370	5,4	
<b>KD</b>	99	39	138	28,3	23,6
	90	21	111	18,9	
<b>GFP-HIP1R FL</b>	33	5	38	13,2	13,2
	0	0	0		
<b>GFP-HIP1R <math>\Delta</math>A</b>	49	26	75	34,7	24,8
	63	11	74	14,9	
<b>GFP-HIP1R <math>\Delta</math>AT</b>	11	3	14	21,4	26,9
	23	11	34	32,4	
<b>GFP-HIP1R <math>\Delta</math>L</b>	52	15	67	22,4	24,1
	23	8	31	25,8	
<b>GFP-HIP1R ELL/AAA</b>	29	22	51	43,1	34,8
	36	13	49	26,5	
<b>GFP-HIP1R KVK/DDD</b>	17	10	27	37,0	36,7
	7	4	11	36,4	
<b>GFP</b>	9	6	15	40,0	34,3
	5	2	7	28,6	

**Tableau 8 : Nombres de cellules HeLa comptées dans l'expérience 1 de KD-restauration et observation d'une endocytose de la transferrine normale, lente ou inexistante.** Les nombres entre parenthèse correspondent au pourcentage du total de cellules.

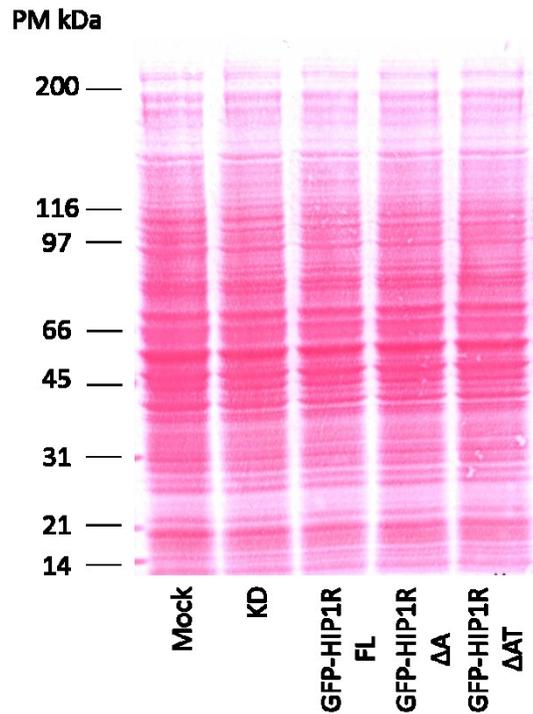
	normale	lente	aucune
<b>Mock</b>	369 (82)	79 (18)	1 (0,2)
	365 (83)	74 (17)	0
<b>KD</b>	364 (85)	47 (11)	19 (4)
	331 (78)	75 (18)	19 (4)
<b>GFP</b>	15 (54)	9 (32)	4 (14)
	31 (54)	21 (37)	5 (9)
<b>GFP-HIP1R FL</b>	113 (78)	25 (17)	7 (5)
	172 (81)	31 (15)	9 (4)
<b>GFP-HIP1R ΔA</b>	179 (85)	33 (15)	1 (0,4)
	174 (85)	27 (13)	3 (1)
<b>GFP-HIP1R ΔAT</b>	54 (82)	8 (12)	4 (6)
	36 (77)	8 (17)	3 (6)
<b>GFP-HIP1R ΔL</b>	72 (92)	4 (5)	2 (3)
	148 (78)	36 (19)	5 (3)
<b>GFP-HIP1R ELL/AAA</b>	102 (78)	27 (21)	2 (2)
	122 (84)	19 (13)	5 (3)

**Tableau 9 : Nombres de cellules HeLa comptées dans l'expérience 2 de KD-restauration et observation d'une endocytose de la transferrine normale, lente ou inexistante.** Les nombres entre parenthèse correspondent au pourcentage du total de cellules.

	normale	lente	aucune
<b>Mock</b>	255 (49,1)	262 (50,5)	2 (0,4)
	265 (62,2)	161 (37,8)	0
<b>KD</b>	168 (39,2)	129 (30,1)	132 (30,8)
	87 (19,9)	197 (45,0)	154 (35,2)
<b>GFP-HIP1R FL</b>	46 (11,3)	221 (54,4)	139 (34,2)
	80 (19,7)	213 (52,3)	114 (28,0)
<b>GFP-HIP1R ΔA</b>	80 (18,6)	237 (55)	114 (26,5)
<b>GFP-HIP1R ELL/AAA</b>	26 (9,1)	155 (54,4)	104 (36,5)

**Tableau 10 : Données brutes de l'expérience de l'effet d'HIP1R sur la progression de la mitose.**

Plaque	Traitement	% prophase	% métaphase	% anaphase	% télophase	nb total de cellules
Mock	Aucun	21	33	31	16	422
KD	siRNA	36	21	21	23	287
GFP- HIP1R FL	siRNA	35	27	10	28	162
	siRNA + ADN	31	14	9	46	35
GFP- HIP1R $\Delta$ AT	siRNA	30	21	14	35	132
	siRNA + ADN	75	12,5	12,5	0	8
GFP- HIP1R $\Delta$ L	siRNA	34	18	13	34	119
	siRNA + ADN	27	13	13	47	15
GFP- HIP1R ELL/AAA	siRNA	36	29	13	21	145
	siRNA + ADN	36	20	26	24	28
GFP- HIP1R KVK/DDD	siRNA	31	28	10	31	183
	siRNA + ADN	14	36	9	41	56



**Figure 25: Ponceau de l'immunoblot de la figure 24. PM : poids moléculaire.**